

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

Efeitos da Suplementação com Creatina e Piruvato Sobre Parâmetros de Estresse Oxidativo e  
Metabolismo Energético em Cérebro de Animais Submetidos à Fenilcetonúria

Tese de Doutorado

Vanessa Trindade Bortoluzzi

Porto Alegre, 2019

#### CIP - Catalogação na Publicação

Bortoluzzi, Vanessa Trindade  
Efeitos da Suplementação com Creatina e Piruvato  
Sobre Parâmetros de Estresse Oxidativo e Metabolismo  
Energético em Cérebro de Animais Submetidos à  
Fenilcetonúria / Vanessa Trindade Bortoluzzi. -- 2019.  
223 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, 2019.

1. phenylketonuria. 2. brain energy metabolism. 3.  
oxidative stress. 4. creatine . 5. pyruvate. I.  
Wannmacher, Clovis Milton Duval, 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 Suplementação com Creatina e Piruvato Sobre Parâmetros de Estresse Oxidativo e  
Metabolismo Energético em Cérebro de Animais Submetidos à Fenilcetonúria

Tese de Doutorado

Vanessa Trindade Bortoluzzi

Orientador: Prof. Dr. Clovis Milton Duval Wannmacher

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do título de  
Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre, 2019

## Agradecimentos

Meu primeiro agradecimento é dedicado às pessoas que me apoiaram e incentivaram nas decisões que me possibilitaram primeiro sonhar, e hoje estar aqui escrevendo estes agradecimentos, recordando todas as pessoas que contribuíram na trajetória do meu doutorado; essas pessoas são os meus pais, Sandra e Elvio, irmã Nicole, e avós Neusa e João (in memoriam), minha família de sangue, e a minha família que a vida me deu de irmãs de coração, que são e foram tantas que não cabe aqui mencionar individualmente.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Clóvis, pelas boas conversas e discussões, orientação, paciência, e por me permitir buscar também à filosofia da ciência, psicologia, política, entre outros tópicos que contribuíram na visão de mundo que pude ampliar através do aprendizado que uma universidade proporciona; agradeço também ao Prof. Dutra pelas discussões, colaboração, conversas, almoços e cafés compartilhados; ao Prof. Diogo Souza, de quem eu sempre vou lembrar como ser humano generoso e cientista inspirador; ao Prof. Emerson, desde os tempos do mestrado presente de alguma forma em diferentes etapas; às Profs. Cris Matté e Marina Leite, ao Prof. Guilhian, e a todos os demais professores com quem tive a oportunidade de, participando das representações discentes, conhecer um pouco de como se constrói a excelência do PPG Bioquímica e da UFRGS.

Agradeço à Iti pela colaboração nos experimentos, e por ter sido minha colega mais presente desde o mestrado; ao Éder pelas discussões e apoio nas frustrações de experimentos que não foram possíveis de realizar. Agradeço às ICs Bruna e Letícia, pela colaboração e dedicação ao meu projeto, e pela oportunidade de orientar alunas tão inteligentes e competentes, com quem aprendi muito também; aos ICs mais antigos, que participaram do início dos experimentos, Juliano e Roberta, cada um especial à sua maneira na realização desse trabalho.

Agradeço também às pessoas que trabalham no Departamento, em especial à Cleia e ao Giordando, com quem tive mais contato e que me auxiliaram em diversos episódios ao longo do mestrado e doutorado.

Sou grata também a pessoas que certamente lembrarei com carinho em outro momento, mas que agora não me ocorrem.

Por fim, mas não menos importante, agradeço às agências de fomento, CAPES e CNPq principalmente, pelas bolsas concedidas e pelo trabalho que essas agências desempenham na promoção e incentivo da ciência nacional. Agradeço à UFRGS, ao ICBS e ao PPG Bioquímica pela oportunidade de desenvolver minha formação numa das melhores instituições do país, na vanguarda do conhecimento e pesquisa produzidos aqui. E agradeço aos governos que acreditaram e investiram na nossa ciência, que se fortaleceu e por isso tem conseguido resistir apesar do desinvestimento e precarização.

## SUMÁRIO

### PARTE I

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
RESUMO .....	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1. Fenilcetonúria: terminologia e classificação .....	13
1.2. Diagnóstico.....	14
1.2.1. Diagnóstico diferencial das hiperfenilalaninemias .....	16
1.3. Tratamento.....	18
1.4. Bioquímica da Fenilcetonúria.....	20
1.4.1. Fenilalanina hidroxilase.....	21
1.5. Neuropatologia da fenilcetonúria .....	22
1.5.1. Desequilíbrio das concentrações de aminoácidos livres no cérebro .....	23
1.5.2. Prejuízo à biossíntese de monoaminas neurotransmissoras.....	24
1.5.3. Síntese proteica cerebral reduzida.....	25
1.5.4. Disfunções da mielinização .....	27
1.5.5. Alterações glutamatérgicas.....	29
1.6. Estresse oxidativo.....	30
1.6.1. Radicais livres e espécies reativas de oxigênio.....	30
1.6.2. Defesas antioxidantes .....	33
1.6.3. Estresse oxidativo na fenilcetonúria .....	34
1.7. Metabolismo energético cerebral.....	35
1.7.1. Rede de fosfotransferência.....	36
1.7.2. Metabolismo energético e neurodegeneração.....	37
1.7.3. Metabolismo energético cerebral na fenilcetonúria .....	39
1.8. Interações entre metabolismo energético e estresse oxidativo.....	39
1.8.1. Antioxidantes, suplementos energéticos e função cognitiva .....	40
2. OBJETIVOS .....	43
2.1. Objetivos gerais.....	43
2.2. Objetivos específicos.....	43

## PARTE II

3. REVISÃO DA LITERATURA CIENTÍFICA .....	45
OXIDATIVE STRESS IN PHENYLKETONURIA .....	45
BRAIN ENERGY METABOLISM IN PHENYLKETONURIA .....	75
4. MATERIAS E MÉTODOS .....	94
5. RESULTADOS .....	95
CREATINE PLUS PYRUVATE SUPPLEMENTATION PREVENTS OXIDATIVE STRESS AND PHOSPHOTRANSFER NETWORK DISTURBANCES IN THE BRAIN OF RATS SUBJECTED TO CHEMICALLY-INDUCED PHENYLKETONURIA.....	95
POSSIBLE RAPPORT BETWEEN OXIDATIVE STRESS AND ENERGY METABOLISM IN BRAIN OF RATS SUBJECTED TO PHENYLKETONURIA: EFFECTS OF CREATINE AND PYRUVATE .....	132

## PARTE III

6. DISCUSSÃO GERAL.....	165
7. CONCLUSÕES.....	174
8. PERSPECTIVAS .....	175
REFERÊNCIAS.....	177
APÊNDICE I – Histórico dos Erros Inatos do Metabolismo.....	210
APÊNDICE II – Deficiência Intelectual nos Erros Inatos do Metabolismo .....	218
APÊNDICE III – Histórico da Fenilcetonúria .....	225
APÊNDICE IV – Triagem neonatal.....	235
ANEXO I – Parecer da Comissão de Ética na Utilização de Animais.....	241
ANEXO II – Considerações Éticas e Tratamento dos Resíduos Biológicos e Químicos.....	242
ANEXO III – Resposta da Primeira Submissão do Artigo <i>Oxidative Stress in Phenylketonuria</i> .....	243



## LISTA DE ABREVIATURAS

AD: *Alzheimer disease*; doença de Alzheimer

AK: *adenylate kinase*; adenilato cinase

BH<sub>4</sub>: tetrahidrobiopterina

CAT: catalase

CK: *creatine kinase*; creatina cinase

Cr: creatina

C-Tyr: *L-[1-11C]-tyrosine*; L-[1-11C]-tirosina

DHPR: dihidropteridina reductase

EIM: erro inato do metabolismo

fMRI: *functional magnetic resonance*; ressonância magnética funcional

G3P: *glyceraldehyde-3-phosphate*; gliceraldeído-3-fosfato

GAPDH: *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*; gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GPx: glutationa peroxidase

GSH: glutationa reduzida

GSSG: dissulfeto de glutationa

GTPCH: GTP ciclo-hidrolase I

HD: *Huntington disease*; doença de Huntington

HK: *hexokinase*; hexockinase

HMGR: 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasereductase

HPA: *hyperphenylalaninemia*; hiperfenilalaninemia

LCR: líquido cefalorraquidiano

L-DOPA: levodopa

LNAA: *large neutral amino acids*; grandes aminoácidos neutros

NOS: *nitric oxide synthase*; óxido nítrico sintase

NOX: NADPH oxidases

PAH: *phenylalanine hydroxylase*; fenilalanina hidroxilase

PAL: *phenylalanine ammonia lyase*; fenilalanina-amônia liase peglada

PCD: pterina-4a-carbinolamina desidratase

PCr: *phosphocreatin*; fosfocreatina



PD: *Parkinson disease*; mal de Parkinson

PET: *positron emission tomography*; tomografia por emissão de positrons/positrons

PK: *pyruvate kinase*; piruvato cinase

PKU: *phenylketonuria*; fenilcetonúria

PTPS: 6-piruvolil-tetraidropterina sintase

Pyr: *pyruvate*; piruvato

RNS: *reactive nitrogen species*; espécies reativas de nitrogênio

ROS: *reactive oxygen species*; espécies reativas de oxigênio

RS: *reactive species*; espécies reativas

SNC: sistema nervoso central

SOD: superóxido dismutase

TCA: *tricarboxylic acid cycle*; ciclo do ácido tricarbóxico

TH: tirosina hidroxilase

TPH: triptofano hidroxilase

Trp: *tryptophan*; triptofano

Trx: tiorredoxinas

Tyr: *tyrosin*; tirosina

$\Delta\mu\text{H}^+$ : gradiente de prótons transmembrana

$\Delta\psi\text{m}$ : potencial da membrana mitocondrial

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Comparativo estresse oxidativo de animais tratados até 14 e 21 dias – página 149

Tabela 2: Comparativo enzimas de fosforil transferência de animais tratados até 14 e 21 dias – página 152

Tabela 3: Erros inatos do metabolismo e deficiência intelectual – página 198

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Metabolismo da fenilalanina – página 22

Figura 2: Fórmulas de Mendel – página 190

Figura 3: Fölling e seus primeiros pacientes – página 205

Figura 4: Gene humano da fenilalanina hidroxilase – página 210

Figura 5: Estrutura cristalina da fenilalanina hidroxilase – página 211

## RESUMO

A fenilcetonúria (PKU) é um erro inato do metabolismo (EIM) causado pelo mau funcionamento da enzima fenilalanina-hidroxilase (PAH) hepática. Se não tratada, a fenilalanina (Phe) se acumula no sangue e nos tecidos dos pacientes, perturbando uma infinidade de processos fisiológicos, afetando notavelmente o desenvolvimento do cérebro e as funções cognitivas. Evidências crescentes mostram que o estresse oxidativo pode estar envolvido na neurofisiopatologia subjacente à PKU, além de distúrbios do metabolismo energético que podem manter estreita relação com os desequilíbrios redox. Como as propriedades da creatina (Cr) e do piruvato (Pyr) permitem que essas substâncias atuem como substratos energéticos e *scavengers* de espécies reativas de oxigênio, propusemos uma associação de Cr com Pyr como uma intervenção para mitigar o estresse oxidativo e o comprometimento da rede de fosforiltransferência em cérebros de ratos Wistar submetidos a um modelo de PKU induzido pela administração de Phe+ $\alpha$ MePhe (inibidor da PAH) até 14 e 21 dias de vida. A indução de PKU promoveu desequilíbrios na homeostase redox e energética no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo, tanto em 14 como em 21 dias, que em grande parte foram prevenidos pela coadministração de Cr+Pyr. Os animais PKU de 21 dias também apresentaram redução da atividade locomotora juntamente com prejuízo da coordenação motora. A coadministração de Cr+Pyr teve um efeito aparentemente ansiolítico, prevenindo o prejuízo locomotor, porém sem prevenir o prejuízo na coordenação motora. Se os distúrbios observados aqui também comprometerem o metabolismo cerebral de pacientes, os portadores de PKU poderiam se beneficiar de intervenções dietéticas que incluam tratar as particularidades redox e energéticas do cérebro relacionadas a este EIM. Assim, uma terapia anaplerótica, levando em consideração a possibilidade de haver um déficit de energia em doenças metabólicas hereditárias—tratável por meio do fornecimento de substratos alternativos—seria de interesse para o manejo dietético da PKU em humanos.

## ABSTRACT

Phenylketonuria (PKU) is an inborn error of metabolism (IEM) caused by the malfunction of the enzyme phenylalanine hydroxylase (PAH). If left untreated, phenylalanine (Phe) accumulates in patients' blood and tissues, disrupting a multitude of physiological processes, notably affecting brain development and cognitive function. Increasing evidence shows that oxidative stress may be involved in the underlying neuropathophysiology of PKU, as well as energy metabolism disorders that may be closely related to redox imbalances. As the properties of creatine (Cr) and pyruvate (Pyr) allow these substances to act both as energetic substrates and scavengers of reactive oxygen species, we proposed an association of Cr with Pyr as an intervention to mitigate oxidative stress and phosphoryl transference network compromise in brains of Wistar rats submitted to a PKU model induced by administration of Phe+ $\alpha$ MePhe (PAH inhibitor) up to 14 and 21 days of life. PKU induction promoted redox and energetic homeostasis imbalances in the cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum, at 14 and 21 days, which were largely prevented by the coadministration of Cr+Pyr. Animals treated up to 21 days also showed decreased locomotor activity along with impaired motor coordination. Coadministration of Cr+Pyr had an apparently anxiolytic effect, preventing locomotor impairment, but with no prevention of motor coordination impairment. If the imbalances observed in this study also compromise the brain's metabolism of patients, PKU patients could benefit from dietary interventions that include treating the brain's redox and energy particularities related to this IEM. Thus, anaplerotic therapy based on the concept that there may be an energy deficit in hereditary metabolic disorders—treatable by providing alternative substrates—would be of interest to the dietary management of PKU in humans.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Fenilcetonúria: terminologia e classificação

A fenilcetonúria (PKU) é a doença metabólica hereditária decorrente do erro inato do metabolismo (EIM) de aminoácidos no qual mutações genéticas designam uma conformação não funcional, ou de baixa atividade, da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH) (Blau 2016). Em seu artigo, Følling inicialmente sugeriu o termo *Imbecillitas phenylpyruvica* para descrever a condição. Alguns anos mais tarde, Jervis (1937) usou o termo *oligofrenia fenilpirúvica* (Jervis 1937). No mesmo ano, Lionel Penrose sugeriu um nome mais curto, *fenilcetonúria*, coerente com a nomenclatura em uso para outros EIMs (alcaptonúria, penstosúria, cistinúria), que persiste até hoje (Penrose and Quastel 1937). Vinte anos depois, o termo “PKU” começou a aparecer em artigos de revistas.

O conjunto das condições que levam ao acúmulo de fenilalanina (Phe) é agrupado sob o termo hiperfenilalaninemia (HPA). Todos os graus de HPA conferem um risco de comprometimento da função cognitiva e neuropsicológica, assim, alguns preferem chamar todas as formas da doença de PKU. Por outro lado, muito poucos pacientes com níveis mais baixos de Phe no sangue apresentam acidúria fenilpirúvica, especialmente quando os níveis de Phe no plasma estão abaixo de 800 mol/l (Hanley 2011). Mais importante, nem todas as formas de HPA estão relacionadas ao locus da PAH. Conseqüentemente, o termo PKU poderia ser reservado para um mapeamento fenotípico para o locus de PAH associado com níveis de Phe no sangue acima de 1 mM, com fenótipos enzimáticos e clínicos correspondentemente graves e uma tolerância para Phe dietética abaixo de 500 mg/dia. A condição frequentemente chamada de HPA não-PKU tem mutações no locus da PAH, níveis de Phe no sangue mais baixos do que na PKU, maior tolerância à dieta e risco reduzido de desenvolvimento cognitivo gravemente comprometido. Mutações em loci não-PAH que perturbam a homeostase da

tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) também prejudicam a hidroxilação da tirosina (Tyr) e do triptofano (Trp) no cérebro e, em geral, estão associadas a um desenvolvimento cognitivo e função neurológica profundamente prejudicados (Blau, Shen et al. 2014).

Não existe padronização em relação à classificação das HPA, sendo a distinção entre HPA-PKU e não PKU a mais simples. Existem diversas formas de se fazer esta classificação, as mais utilizadas levam em consideração os níveis de Phe sanguíneos no momento do diagnóstico, em vigência de dieta normal (Levy, Milanowski et al. 2007), ou a atividade residual de PAH, medida através de biópsia do fígado dos pacientes. Atividades residuais de até aproximadamente 1% são compatíveis com PKU clássica, ao passo que em torno de 35% de atividade enzimática é classificada como HPA não PKU (Blau, Bernegger et al. 2003). Neste trabalho adotou-se a classificação feita com base nas concentrações plasmáticas de Phe, como segue (Scriver CR 2001):

a) HPA não PKU: condição na qual os níveis de Phe no sangue permanecem entre 2 e 6 mg/dl (120-600 µmol/l) em dieta normal;

b) HPA transitória: condição transitória causada pela imaturidade temporária de PAH, caracterizada por níveis plasmáticos de Phe elevados logo após o nascimento que se normalizam após poucas semanas de vida pós-natal;

c) PKU moderada: os níveis de Phe plasmáticos ficam em torno de 6 a 20 mg/dl (600-1200 µmol/l);

d) PKU clássica: condição causada pela deficiência da PAH na qual os níveis plasmáticos de Phe são comumente superiores a 20 mg/dl (>1200 µmol/l).

## 1.2. Diagnóstico

Atualmente, para quase todos os pacientes com PKU, o diagnóstico e o início do tratamento resultam da triagem neonatal. O teste do pezinho em recém-nascidos detecta altos

níveis de Phe, possibilitando iniciar o tratamento dietético nas primeiras semanas de vida, antes que sintomas clínicos apareçam. Quando a triagem é realizada em maternidades, a amostra de sangue é obtida entre 2 e 7 dias após o nascimento. Comumente se considera concentrações de Phe entre 120-30  $\mu\text{mol/l}$  como positivo para HPAs em geral (van Wegberg, MacDonald et al. 2017). A espectrometria de massa em tandem é consenso mundial no diagnóstico de EIMs e, portanto, das HPAs. Esse método produz uma taxa menor de resultados falsos positivos, medindo os níveis de Phe e Tyr e fornecendo a razão Phe/Tyr (razões  $\geq 2$  são compatíveis com diagnóstico positivo para HPAs); não havendo acesso à metodologia de espectrometria de massas, o diagnóstico pode ser confirmado pela determinação fluorimétrica de Phe no soro, por cromatografia de troca iônica através de analisadores de aminoácidos, ou por cromatografia líquida de alta eficiência (Chace, Sherwin et al. 1998, Therrell, Padilla et al. 2015).

Alguns lactentes, particularmente aqueles nascidos prematuramente, podem apresentar imaturidade dos sistemas enzimáticos envolvidos no metabolismo de aminoácidos, resultando em uma elevação transitória de Phe a um nível suficiente para diagnóstico positivo para PKU em um teste de triagem. Os resultados da triagem precoce da PKU também devem ser interpretados com cautela em neonatos doentes ou em neonatos sob nutrição parenteral ou que passaram por transfusão sanguínea, e um segundo teste de triagem deve ser realizado se não ficar claro se a criança havia ingerido proteína suficiente quando o primeiro teste foi coletado. Há receio de que a triagem muito cedo, associada à tendência de diminuição do período de internação na maternidade no pós-parto, possa fornecer um resultado falso negativo, uma vez que não terá havido tempo para a Phe proveniente da dieta atingir níveis de diagnóstico (e tóxicos). No entanto, é amplamente aceito que a sensibilidade da triagem em um recém-nascido saudável é adequada antes das 24 h de vida, especialmente quando o teste de triagem envolve a mensuração das razões Phe/Tyr para aumentar a sensibilidade em relação à medida da Phe sozinha (Chace, Sherwin et al. 1998, J.W. Eastman 2000).



### 1.2.1. Diagnóstico diferencial das hiperfenilalaninemias

Por muito tempo, a HPA foi considerada um marcador metabólico específico para PKU clássica. No entanto, pacientes que sofrem de deficiência de BH<sub>4</sub>, cofator natural de hidroxilases de aminoácidos aromáticos, compartilham com os pacientes portadores de PKU os elevados níveis sanguíneos de Phe. Os pacientes com distúrbios do metabolismo da BH<sub>4</sub>, incluindo a deficiência da GTP ciclo-hidrolase I (GTPCH), deficiência da 6-piruvilil-tetrahydropterina sintase (PTPS), deficiência da dihydropteridina redutase (DHPR) e deficiência de pterina-4a-carbinolamina desidratase (PCD) podem apresentar qualquer grau de HPA (Opladen, Hoffmann et al. 2012). Aproximadamente 2% dos recém-nascidos que apresentam hiperfenilalaninemia são portadores de mutações relacionadas à BH<sub>4</sub>, por isso é pertinente considerar o diagnóstico diferencial toda vez que se identifica altos níveis de Phe através da triagem neonatal.

De acordo com os protocolos atuais, as seguintes investigações devem ser realizadas em todos os recém-nascidos com HPA (Phe no sangue >120 µmol/l): 1) análise de pterinas (neopterina, biopterina e primapterina) na urina; 2) medição da atividade DHPR em manchas de sangue seco do cartão de Guthrie; e 3) análise de Phe e Tyr no plasma ou sangue antes e após 24h da ingestão de BH<sub>4</sub> na dose de 20 mg/kg de peso corporal. Os testes 1 e 2 são essenciais para todos os recém-nascidos e identificam variantes de deficiência de BH<sub>4</sub> em crianças mais velhas, não responsivas à dieta, segundo perfis característicos de pterina: deficiência de GTPCH com baixa neopterina e biopterina, deficiência de PTPS com alta neopterina e apenas traços de biopterina, deficiência de PCD com alta neopterina e alta primapterina, e deficiência de DHPR com neopterina normal ou moderadamente elevada e biopterina alta. O teste 2 identifica pacientes com deficiência de DHPR, que às vezes podem não ser identificados no teste 1 se a urina for coletada sob dieta pobre em proteínas. O teste 3 é útil em todas as formas de deficiência de BH<sub>4</sub> e também pode detectar pacientes com deficiência de PAH responsiva a BH<sub>4</sub> (van Wegberg, MacDonald et al. 2017).

#### 1.2.1.1. Sobrecarga de BH<sub>4</sub>

Inicialmente, o teste de sobrecarga de BH<sub>4</sub> era utilizado para distinguir entre HPA causada por deficiência da PAH ou por deficiência relacionada ao cofator em questão. A importância deste teste reside em identificar pacientes responsivos que podem se beneficiar da administração oral de BH<sub>4</sub> (sapropterina dicloridrato), em alguns casos até mesmo prescindindo da dieta de restrição de Phe (Levy, Milanowski et al. 2007). Além disso, as mutações que interferem no metabolismo da BH<sub>4</sub> são mais severas que a PKU no que diz respeito à resposta ao tratamento, que é substancialmente diferente do da PKU, e também porque a BH<sub>4</sub> é cofator para produção de catecolaminas, serotonina e óxido nítrico no sistema nervoso central (SNC) (Hyland, Surtees et al. 1993, Zorzi, Thony et al. 2002). O sucesso do tratamento farmacológico com BH<sub>4</sub> é maior em casos de HPA moderada não-PKU, ou PKU moderada, resultante de mutações que permitem atividade residual da PAH; uma redução dos níveis de Phe de 30% é considerada clinicamente significativa (Blau 2013).

#### 1.2.1.2. Exame do líquido

Como mencionado acima, BH<sub>4</sub> é o cofator não somente da PAH, mas também triptofano hidroxilase (TPH), tirosina hidroxilase (TH) e óxido nítrico sintase (NOS). A medida dos seus metabólitos no líquido cefalorraquidiano (LCR) permite a distinção entre formas brandas e mais severas das HPAs causadas por defeitos na síntese e reciclagem de BH<sub>4</sub> (Jaggi, Zurfluh et al. 2008); as dosagens de BH<sub>4</sub>, precursores de neurotransmissores, níveis de ácido 5-hidroxiindolacético e ácido homovanílico no LCR são parâmetros essenciais no acompanhamento de pacientes.

### 1.3. Tratamento

O objetivo primordial do tratamento da PKU é baixar os níveis de Phe no sangue, seguido da necessidade de atender às demandas nutricionais através da alimentação. Dessa forma, o tratamento da PKU e HPAs consiste de uma dieta pobre em Phe, suplementada com fórmula médica contendo aminoácidos não-Phe e outros nutrientes com o intuito de suprir a síntese fisiológica de proteínas e contrabalançar o catabolismo, sem fornecer energia em excesso. Há mais de 60 anos, Bickel e colaboradores demonstraram pela primeira vez que a adesão estrita à dieta previne sequelas neurológicas graves em pacientes (Bickel, Gerrard et al. 1953) e, ainda hoje, a dieta continua a ser o pilar do tratamento. Existe um consenso geral sobre a importância do controle rigoroso dos níveis sanguíneos de Phe dentro de uma faixa alvo, que previne desfechos adversos, desde o nascimento até os 12 anos de idade (120 a 360  $\mu\text{mol/l}$ ) (Camp, Parisi et al. 2014, van Wegberg, MacDonald et al. 2017). Para pacientes com idade acima de 12 anos (exceto no período preconcepção e durante a gravidez), as diretrizes europeias consideram que a faixa de 120-600  $\mu\text{mol/l}$  de Phe no sangue seja segura durante a adolescência e a idade adulta (van Wegberg, MacDonald et al. 2017), enquanto as diretrizes dos EUA defendem uma faixa mais estreita, entre 120 a 360  $\mu\text{mol/l}$  (Camp, Parisi et al. 2014).

Apesar da eficácia teórica do tratamento dietético, o seu sucesso real depende do fornecimento de uma dieta aceitável e prática para o paciente. Fatores subjetivos que podem dificultar a aceitação incluem má palatabilidade, cheiro ou textura desagradável, falta de variedade alimentar e neofobia alimentar<sup>1</sup> (Evans, Daly et al. 2016). A adesão a substitutos proteicos que devem ser consumidos pelo menos três vezes ao dia durante toda a vida é um desafio particular. A escolha adequada de alimentos socialmente aceitáveis é particularmente importante para melhorar a adesão à medida que os pacientes passam da infância para a adolescência, já que eles têm mais responsabilidade em administrar seu tratamento e estão

---

<sup>1</sup> Literalmente o medo de alimentos novos.

expostos a novas escolhas alimentares e à pressão de colegas fora de casa (Walter, White et al. 2002, Lammardo, Robert et al. 2013).

Quando o paciente não responde bem a restrição dietética de Phe, deve-se realizar o diagnóstico diferencial para desordens de síntese e reciclagem de BH<sub>4</sub>. Duas categorias de indivíduos com PKU responsivos à BH<sub>4</sub> podem obter melhor qualidade de vida e benefícios nutricionais com o uso de sapropterina (análogo sintético de BH<sub>4</sub>). Para alguns pacientes que não conseguem aderir à terapia dietética ou são incapazes de manter um nível de restrição alimentar e ingestão de alimentos médicos que controlem suficientemente a Phe sanguínea, a sapropterina pode reduzir a Phe sanguínea a uma faixa aceitável sem modificações dietéticas adicionais. Ainda, os pacientes cuja terapia dietética e aderência já mantêm os níveis sanguíneos de Phe dentro de uma faixa terapêutica podem aumentar a ingestão de proteína natural, impactando positivamente o estado nutricional (Levy, Burton et al. 2007), e a qualidade de vida é reforçada com a flexibilização da dieta. Deve-se avaliar se os pacientes que têm deficiência de BH<sub>4</sub> podem prescindir da dieta restrita em Phe, sua resposta à administração oral de sapropterina, e a necessidade de administração de levodopa (L-DOPA) e 5-hidroxitriptofano (Levy, Burton et al. 2007).

Além da sapropterina, ainda sem protocolo padrão definido, outras estratégias de tratamento têm surgido ou estão sendo desenvolvidas, incluindo suplementos alimentícios mais palatáveis, glicomacropéptidos (Ney, Gleason et al. 2009, Camp, Parisi et al. 2014) e utilização de aminoácidos neutros (LNAA) (Pietz, Kreis et al. 1999, Camp, Parisi et al. 2014, van Vliet, Bruinenberg et al. 2015). Há ensaios clínicos empregando uma abordagem terapêutica enzimática com fenilalanina-amônia liase peglada (PAL)<sup>2</sup>, e estudos pré-clínicos em terapia genética com chaperonas em andamento. Estas estratégias terapêuticas têm como alvo a Phe

---

<sup>2</sup> Enzima monomérica que não requer cofatores. Está presente em plantas e leveduras e é uma alternativa para obtenção de carbono e nitrogênio a partir de L-Phe; converte o excesso de Phe em ácido transcinâmico e quantidades insignificantes de amônia. O ácido transcinâmico é rapidamente convertido em ácido hipúrico e excretado na urina Fritz, R. R., D. S. Hodgins and C. W. Abell (1976). "Phenylalanine ammonia-lyase. Induction and purification from yeast and clearance in mammals." *J Biol Chem* 251(15): 4646-4650.

ingerida quando esta chega ao trato intestinal, no caso da PAL, ou promover a conformação adequada de PAH através de chaperonas farmacológicas (Sarkissian and Gamez 2005, Underhaug, Aubi et al. 2012).

#### 1.4. Bioquímica da Fenilcetonúria

A Phe existe na forma de enantiômeros D e L, e a L-Phe é um aminoácido essencial necessário para a síntese de proteínas em humanos. Tal como acontece com muitos outros metabolitos, as concentrações de Phe são reguladas a um nível estacionário com fluxo de entrada e de saída dinâmico. A perturbação persistente no fluxo acabará por resultar na alteração das concentrações no estado estacionário. A ingestão dietética de Phe, juntamente com a reciclagem endógena de reservas de aminoácidos, são as principais fontes de Phe, enquanto que a utilização ou eliminação de Phe ocorre via integração em proteínas, oxidação em Tyr ou conversão em outros metabólitos (Fig. 1) (Williams, Mamotte et al. 2008). Normalmente, 75% da Phe é convertida em Tyr por hidroxilação e 25% é incorporada a proteínas (McGee, Greengard et al. 1972).

A conversão de Phe em Tyr ocorre por um sistema de hidroxilação que envolve a PAH, o cofator pterina não conjugado,  $BH_4$ , e enzimas que servem para regenerar a  $BH_4$ , nomeadamente DHPR e PCD. Embora a para-hidroxilação de Phe seja essencial para a ruptura do anel benzênico, ela não é necessária para o metabolismo posterior da cadeia lateral de alanina. Essa via alternativa de transaminação e descarboxilação leva à formação de metabólitos como fenilpiruvato, fenilactato, e o-hidroxifenilacetato que são excretados na urina.

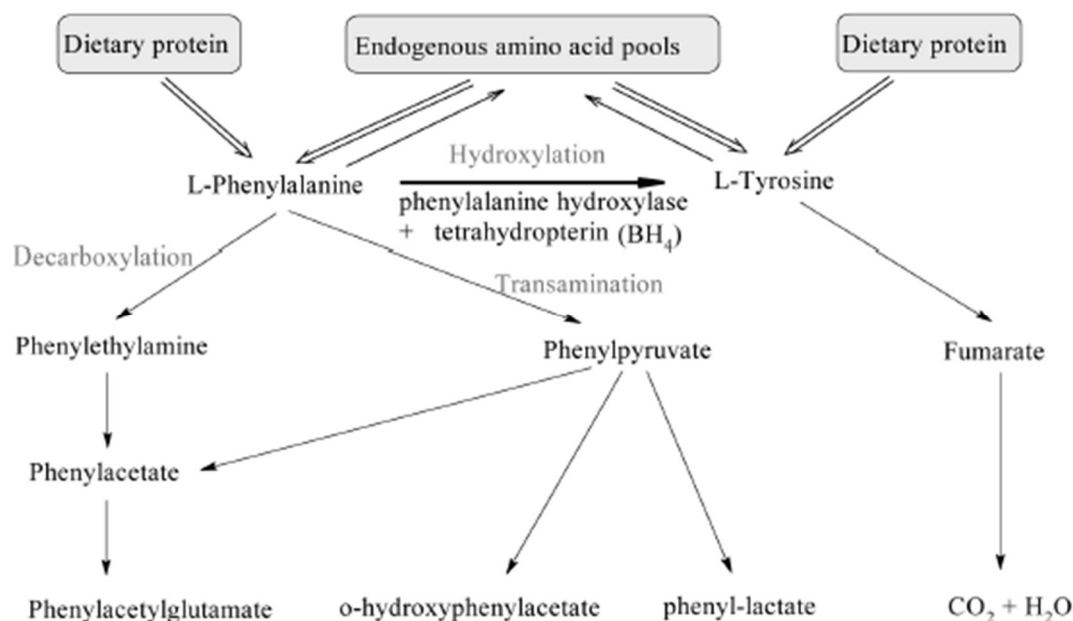


Fig. 1: Metabolismo da Phe em humanos. A L-Phe é proveniente da dieta e da reciclagem de pools de aminoácidos. A hidroxilação da L-Phe pela PAH, com o cofator BH<sub>4</sub> e na presença de O<sub>2</sub> molecular, produz L-Tyr. O metabolismo alternativo da L-Phe por descarboxilação ou transaminação produz vários metabolitos que são excretados na urina (Williams, Mamotte et al. 2008).

A conversão de Phe para Tyr tem duas implicações: primeiro, impulsiona a produção endógena do aminoácido não essencial Tyr; segundo, essa reação de hidroxilação é a etapa limitante para a oxidação completa de Phe em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O e contribui para o pool de glicose e metabólitos de dois carbonos (Kaufman 1999).

#### 1.4.1. Fenilalanina hidroxilase

Para conservar as quantidades necessárias à síntese proteica e remover o excesso de L-Phe, a PAH de mamíferos desenvolveu mecanismos de regulação e uma estrutura específica através da qual as propriedades reguladoras são exercidas pelo cofator BH<sub>4</sub>, alostericamente pelos níveis de L-Phe, e por fosforilação (Flydal and Martinez 2013). O cofator BH<sub>4</sub> exerce um efeito regulador inibitório sobre PAH, estabilizando a enzima em um estado tenso (T), por sua vez revertido pela ativação alostérica promovida por L-Phe. A atividade da PAH tetramérica, quando analisada na presença de BH<sub>4</sub>, é ativada através de incubação com L-Phe, respondendo com cooperatividade positiva ao aumento das concentrações de substrato. A necessidade de

finos ajustes conformacionais para a ativação alostérica de PAH por L-Phe pode ser observada na ausência de cooperatividade positiva em mutantes da PAH humana associados à PKU que ainda mantêm a estrutura tetramérica. (Fusetti, Erlandsen et al. 1998). Os modelos atuais para explicar a regulação alostérica positiva através de L-Phe descrevem a transição do estado T, menos ativo e com baixa afinidade para o ligante, para um estado relaxado (R), mais ativo e de alta afinidade pelo ligante. O mecanismo desta ativação ainda não é compreendido e não há consenso se esta é causada pela ligação de L-Phe em um sítio alostérico no domínio regulador ou no próprio sítio ativo. A fosforilação de PAH na Ser16, estimulada por glucagon através da ativação de proteínas cinases dependentes de adenosina monofosfato cíclico, aumenta a afinidade da enzima por L-Phe e então ativa PAH em sinergismo com a ativação promovida por L-Phe (Flydal and Martinez 2013). Estudos envolvendo mutagênese sítio-dirigida e modelagem molecular sugerem que a fosforilação provoca mudanças conformacionais locais, impulsionadas principalmente por eletrostática, que aumentam a acessibilidade do local de ligação do substrato (Miranda, Teigen et al. 2002).

### 1.5. Neuropatologia da fenilcetonúria

Os primeiros estudos tentando elucidar a neuropatologia da PKU começaram em seguida da descoberta da excreção de metabólitos da Phe na urina de pacientes acometidos de deficiência intelectual. Os relatos iniciais apontavam achados variáveis e inespecíficos, insuficientes para explicar a condição de evidente dano cerebral apresentada pelos pacientes (Penrose and Quastel 1937, Penrose 1939, Josephy 1948). A anomalia mais consistente observada nos portadores de PKU era o cérebro menor em comparação ao de indivíduos não portadores, em média 80% do tamanho de um cérebro normal (Jervis 1954). Os mecanismos através dos quais a deficiência de PAH hepática é “transportada” para o cérebro, já que se trata de uma enzima expressa no fígado, ainda não são completamente conhecidos. O entendimento

atual da gênese das consequências neurológicas da PKU é de que estas são em decorrência do acúmulo de Phe no sangue, já que o acúmulo de outros metabólitos potencialmente tóxicos ao SNC não é suficiente para causar dano cerebral. As principais implicações dos altos níveis de Phe no sangue podem ser abordadas em termos de efeitos sobre as concentrações de aminoácidos livres no cérebro, efeitos sobre a biossíntese de dopamina e outros neurotransmissores, efeitos na síntese proteica e efeitos sobre a síntese e renovação da mielina. Ainda, existem alterações do metabolismo energético cerebral associadas à hiperfenilalaninemia, e mais recentemente o estresse oxidativo tem sido reconhecido entre os mecanismos fisiopatológicos que levam ao dano cerebral na PKU.

#### 1.5.1. Desequilíbrio das concentrações de aminoácidos livres no cérebro

O transporte de aminoácidos do sangue para o cérebro é um processo que envolve nove transportadores de aminoácidos (Smith 2000), cada um com habilidade de se ligar a um conjunto mais ou menos específico de aminoácidos. O transportador de grandes aminoácidos neutros do tipo 1 (LAT1) se liga seletivamente aos LNAAs (além de Phe e Tyr, valina, isoleucina, leucina, metionina, treonina, Trp, e histidina), em um processo competitivo (Pardridge 1998, Boado, Li et al. 1999, Smith 2000). Além disso, o transportador LAT1 é um contratransportador, excretando um LNAA para cada LNAA que entra no cérebro (Zielke, Zielke et al. 2002). Em concentrações fisiológicas de LNAA, o transportador LAT1 está quase totalmente saturado. Este transportador tem diferentes afinidades e valores de  $K_m^3$  para cada LNAA, e Phe tem o menor valor de  $K_m$ , indicando que se liga o transportador LAT1 mais fortemente do que outros LNAAs (Pardridge 1998, Smith 2000, Zielke, Zielke et al. 2002). Conseqüentemente, elevadas concentrações plasmáticas de Phe aumentam a captação de Phe do sangue para o cérebro e reduzem a captação de LNAAs não-Phe através de dois mecanismos:

---

<sup>3</sup> O valor de  $K_m$  é a concentração de substrato na qual a taxa de reação é 50% do seu valor máximo.



primeiro, a absorção de LNAAs não-Phe no cérebro é reduzida devido à inibição competitiva por Phe; em segundo lugar, a exportação de LNAAs não-Phe do cérebro para o sangue é aumentada (van Vliet, Bruinenberg et al. 2015). Assim, o efeito primário da HPA sobre o cérebro é aumentar a concentração de Phe e reduzir a concentração de outros LNAAs, consequência da competição por transporte através da barreira hematoencefálica (Pietz, Kreis et al. 1999, Moats, Moseley et al. 2003).

#### 1.5.2. Prejuízo à biossíntese de monoaminas neurotransmissoras

A biossíntese dos neurotransmissores monoaminérgicos dopamina, noradrenalina e serotonina depende da disponibilidade cerebral de seus aminoácidos precursores Tyr e Trp (Hommes and Lee 1990). O excesso de Phe e a falta de Tyr e Trp acarretam a deficiência na biossíntese desses neurotransmissores, e além de diminuir a disponibilidade aminoácidos precursores, o excesso de Phe tem efeito inibitório sobre a atividade das enzimas TH e TPH (Pascucci, Andolina et al. 2009).

Estudos em camundongos geneticamente modificados para desenvolverem PKU (Pah<sup>enu2</sup>) mostram diminuição das concentrações de dopamina, catecolaminas e serotonina em homogeneizado de cérebro (Pascucci, Ventura et al. 2002, Pascucci, Andolina et al. 2008, Pascucci, Andolina et al. 2009) e em diferentes regiões cerebrais, como córtex pré-frontal, amígdala, hipocampo, e estriado (Puglisi-Allegra, Cabib et al. 2000, Embury, Charron et al. 2007). Ainda, há relatos de redução da densidade corporal de células dopaminérgicas na substância negra e nigrostriatum (Embury, Reep et al. 2005, Embury, Charron et al. 2007), possivelmente devido à diminuição da síntese de dopamina. Consistentemente, foram observadas concentrações reduzidas de dopamina, catecolaminas, serotonina e seus metabólitos, similares àquelas encontradas no cérebro de camundongos PKU, no tecido cerebral (McKean 1972) e LCR (Butler, O'Flynn et al. 1981, Burlina, Bonafe et al. 2000) de pacientes com PKU. O tratamento dietético restaura as concentrações de metabólitos de

neurotransmissores no LCR, assim como a suplementação de Tyr e Trp (Lou 1985). Em conjunto, esses achados sugerem que as concentrações reduzidas de neurotransmissores na PKU são causadas pela redução da síntese de neurotransmissores, e não por aumento da degradação dos neurotransmissores.

A repercussão clínica da redução das concentrações dessas monoaminas no cérebro de pacientes com PKU ainda não está completamente elucidada. A dopamina tem sido mais extensivamente estudada, e sabe-se que sua redução pode ser mais problemática para neurônios pré-frontais, que têm um maior *turnover* de dopamina que neurônios em outras regiões cerebrais (Diamond 1996, Anderson, Wood et al. 2007). A disponibilidade de dopamina no córtex pré-frontal dorsolateral é importante em tarefas executivas e, portanto, pode explicar o desempenho neuropsicológico prejudicado observado em pacientes com PKU (Anderson, Wood et al. 2007, Canton, Gall et al. 2019). Além disso, os pacientes com PKU não tratada podem desenvolver coreia, tremores e distonia (Pietz 1998), sintomas possivelmente causados por deficiência de dopamina nos gânglios da base. A deficiência de serotonina no cérebro pode explicar o aumento da ocorrência de transtornos de ansiedade e depressão em pacientes com PKU (Anderson, Wood et al. 2007).

Embora tanto a dopamina quanto a serotonina estejam provavelmente envolvidas no desenvolvimento e maturação cerebral pós-natal, o retardo mental grave não é a característica mais marcante das deficiências congênitas desses neurotransmissores em humanos (Kurian, Gissen et al. 2011). Portanto, as deficiências dos neurotransmissores cerebrais parecem não explicar completamente a apresentação clínica da PKU, mas provavelmente explicam certas deficiências cognitivas.

### 1.5.3. Síntese proteica cerebral reduzida

Os efeitos de níveis elevados de Phe sobre a síntese proteica cerebral já foram demonstrados em modelos animais e em pacientes, e acredita-se que isso resulte do transporte

prejudicado de LNAAAs através da barreira hematoencefálica. Conforme observado em HPAs crônicas farmacologicamente induzidas em camundongos (Binek, Johnson et al. 1981, Binek-Singer and Johnson 1982), e após uma única injeção de Phe (Hughes and Johnson 1978), esse efeito sobre a síntese proteica reflete-se em redução do número de polirribossomas e em aumento correspondente do número de monorribossomas inativos, além de diminuição no alongamento de polipeptídeos. A HPA também previne a fosforilação da proteína ribossomal S<sub>6</sub>, o que influencia a iniciação da síntese proteica (Roberts and Morelos 1982). A suplementação com LNAA restaurou a formação de polirribossomas e o alongamento de polipeptídeo parcialmente (Hughes and Johnson 1978) ou completamente (Binek, Johnson et al. 1981, Binek-Singer and Johnson 1982), restaurou as concentrações de LNAA no cérebro (Binek-Singer and Johnson 1982), e reverteu o efeito sobre a proteína ribossomal S<sub>6</sub> (Roberts and Morelos 1982). Nesses estudos, as concentrações de Phe no cérebro não foram alteradas, sugerindo que a síntese de proteínas cerebrais pode ser mais afetada pela redução das concentrações cerebrais de LNAA não-Phe do que pelas concentrações elevadas de Phe.

Estudos realizados em pacientes portadores de PKU usando tomografia por emissão de pósitrons (PET), com L-[1-<sup>11</sup>C]-tirosina (C-Tyr) como marcador, mostraram que incorporação de C-Tyr a proteínas cerebrais é inversamente associada às concentrações cerebrais de Phe, corroborando que concentrações elevadas de Phe no cérebro e processos bioquímicos associados podem reduzir a síntese proteica cerebral na PKU (de Groot, Hoeksma et al. 2013, de Groot, Sijens et al. 2015).

Sob essa perspectiva, as concentrações reduzidas de LNAA não-Phe no cérebro, ao invés das concentrações elevadas de Phe, poderiam ser consideradas como o principal mecanismo fisiopatológico da disfunção cognitiva na PKU. A síntese proteica cerebral reduzida pode ser um dos principais mecanismos pelos quais a PKU não tratada resulta em retardo mental. A síntese proteica está envolvida em muitos processos durante o desenvolvimento do cérebro, incluindo diferenciação neuronal, maturação, migração, plasticidade sináptica e

formação de redes funcionais (Rao and Jacobson 2006, Vaillend, Poirier et al. 2008). Dessa forma, a síntese proteica reduzida pode afetar negativamente a cognição através de muitos mecanismos. De fato, a diminuição da síntese proteica tem sido descrita também em outras doenças hereditárias que apresentam a deficiência intelectual como principal característica (Greer and Greenberg 2008, Vaillend, Poirier et al. 2008). Os processos de desenvolvimento cerebral dependentes de síntese proteica continuam na terceira década de vida (Aine, Sanfratello et al. 2011, Petanjek, Judas et al. 2011), e a plasticidade sináptica dependente de síntese proteica ocorre ao longo de toda a vida (Saneyoshi, Fortin et al. 2010). Assim, também na idade adulta, a síntese proteica reduzida poderia contribuir para o funcionamento cerebral prejudicado.

#### 1.5.4. Disfunções da mielinização

A primeira descrição detalhada de palidez na marcação de mielina na substância branca na PKU data de 1950. Alvord e colaboradores encontraram alterações relacionadas à mielina em 3 de 5 pacientes, principalmente em áreas que mielinizam após o nascimento, incluindo a substância branca subcortical, evidenciadas pela fraca marcação das bainhas de mielina. Eles também observaram gliose astrocitária nas áreas de palidez da mielina, e que a mielinização da medula espinhal apresentava-se severamente prejudicada (Alvord, Stevenson et al. 1950). Muitos autores desde então relataram alterações relacionadas à mielina no SNC de pacientes portadores de PKU, com diferenças na extensão e severidade das lesões, levando à conclusão de que as alterações estruturais da mielina são distintas em todos os casos de PKU. Apesar das particularidades de cada paciente, a maioria dos casos apresenta alterações da substância branca, normalmente associadas à palidez da mielina e gliose (Huttenlocher 2000). As principais hipóteses para explicar a hipomielinização ou desmielinização observada na PKU dão conta de três aspectos: maior *turnover* de componentes da mielina (Taylor and Hommes 1983, Hommes 1991, Hommes and Moss 1992); transformação de oligodendrócitos em um

fenótipo não-mielinizante (Dyer, Kendler et al. 1996); e síntese de colesterol prejudicada (Shefer, Tint et al. 2000). Ainda, especula-se que as disfunções da mielinização na PKU possam estar relacionadas à redução da síntese proteica (de Groot, Hoeksma et al. 2010).

O aumento do *turnover* de componentes da mielina está associado à inibição do sistema de ativação de sulfato. Este sistema consiste de duas enzimas que atuam em sequência para converter sulfato inorgânico em adenosina fosfosulfato (ATP sulforilase) e a seguir em fosfoadenosina fosfosulfato (APS fosfoquinase). A fosfoadenosina fosfosulfato é um doador de sulfato em uma variedade de reações que produzem sulfatídeos da mielina, entre outros produtos sulfatados. Experimentos demonstraram que a ATP sulforilase cerebral é sensível à Phe (Matsuo, Moss et al. 1987), e que essa sensibilidade é paralela à taxa de mielinização e está distribuída exclusivamente na substância branca cerebral (Matsuo and Hommes 1987). Isso leva à hipótese de que a inibição da ATP sulforilase por Phe na oligodendroglia causa diminuição da disponibilidade de cerebrosideo sulfato, que então não é capaz de proteger efetivamente a proteína básica da mielina da degradação proteolítica (Dyer, Kendler et al. 1996), o que pode estar por trás do fenótipo não-mielinizante.

A redução da mielinização na PKU pode ser causada pela deficiência na síntese do colesterol devido à atividade reduzida de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMGR), a enzima controladora de taxa de síntese de colesterol. Como o colesterol é um dos principais constituintes do lipídeo da mielina, a diminuição da atividade de HMGR pode resultar na redução da mielinização no prosencéfalo de camundongo PKU e no fenótipo não-mielinizante de oligodendroglia. No entanto, a atividade reduzida de HMGR parece ser principalmente causada pela redução da síntese de HMGR, sugerindo que a síntese proteica cerebral reduzida pode afetar enzimas envolvidas na formação da mielina (Shefer, Tint et al. 2000).

### 1.5.5. Alterações glutamatérgicas

Há apenas um número limitado de estudos acerca da ação da Phe sobre a transmissão sináptica glutamatérgica, boa parte deles realizados por Glushakov e colaboradores entre 2003 e 2005. O grupo observou que, em culturas primárias de neurônios submetidos a concentrações de Phe comparáveis às observadas nos pacientes, ocorre inibição da atividade glutamatérgica. Tal efeito se deve à competição de Phe com glicina pelo sítio de ligação da glicina dos receptores NMDA, e com glutamato pelo sítio de ligação do glutamato nos receptores AMPA (Glushakov, Dennis et al. 2003, Glushakov, Glushakova et al. 2005, Martynyuk, Glushakov et al. 2005). Estudos em camundongos *Pah<sup>enu2</sup>* mostraram que isto se reflete em mudanças de longo prazo na transmissão sináptica glutamatérgica, com aumento pronunciado da expressão proteica da subunidade NR2A do receptor glutamatérgico, bem como do receptor AMPA (subunidade Glu 1, 2 e 3), com uma pequena redução da subunidade NR2B (Glushakov, Glushakova et al. 2005). Ainda, Zhang e colaboradores demonstraram aumento da expressão gênica de receptores metabotrópicos, e também do tipo NMDA, em neurônios corticais cultivados em condições HPA (Zhang and Gu 2005).

Em um estudo recente (ainda não publicado), nosso grupo observou aumento da concentração de glutamato no líquido de ratos hiperfenilalaninêmicos, concomitantemente com diminuição da captação de glutamato em córtex cerebral e hipocampo. Esses resultados sugerem que o aumento de glutamato no líquido está relacionado à diminuição da captação do mesmo, e que tais alterações foram causadas pelos elevados níveis de Phe. Além disso, também ocorreram alterações da concentração de S100B—proteína secretada pelos astrócitos que pode ter ação trófica ou tóxica, dependendo de sua concentração—com diminuição da concentração desta em córtex cerebral e aumento no líquido do grupo HPA (Cortes 2015).

A neurotransmissão glutamatérgica desempenha um papel fundamental na densidade e função sináptica, memória e aprendizagem, epilepsia, arborização dendrítica e regulação da

apoptose no cérebro imaturo (Collingridge, Kehl et al. 1983, Fox, Daw et al. 1991, Ikonomidou, Bosch et al. 1999, Pawlak, Schupp et al. 2005, Rowland, Astur et al. 2005, Tsukada, Nishiyama et al. 2005, Meador 2007, Ewald, Van Keuren-Jensen et al. 2008). Dado o importante papel do sistema glutamatérgico no desenvolvimento e função do cérebro, essas mudanças podem, pelo menos em parte, explicar o distúrbio cerebral associado à PKU não tratada, porém a repercussão em termos das alterações de desenvolvimento do SNC, bem como de comportamento apresentadas pelos pacientes, requer mais investigações.

## 1.6. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo tem sido identificado entre os principais fatores contribuintes na fisiopatologia de várias doenças e condições, incluindo câncer (Sosa, Moline et al. 2013), Alzheimer (Markesbery 1999, Huang, Zhang et al. 2016), e doenças metabólicas (Ribas, Sitta et al. 2011, Rani, Deep et al. 2016, Stepien, Heaton et al. 2017, Parmeggiani and Vargas 2018). O estresse oxidativo é induzido por um desequilíbrio no estado redox, envolvendo a geração de excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS), ou a disfunção do sistema antioxidante. Sua origem é geralmente multifatorial e raramente pode ser atribuída a um mecanismo isolado (Halliwell 2007).

### 1.6.1. Radicais livres e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

Os radicais livres podem ser definidos como átomos ou moléculas dotados de um ou mais elétrons desemparelhados em seus orbitais externos, o que gera instabilidade e alta reatividade nessas espécies que tenderão a adquirir um elétron a fim de estabilizar o orbital mais externo. Assim, a presença de um único radical pode iniciar uma sequência de reações em cadeia de transferência de elétrons em que um único radical pode levar à formação de um

produto que também é um radical livre e que, por sua vez, reage produzindo um terceiro radical e assim sucessivamente (Halliwell 2007). ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS) incluem ambos os radicais livres, como superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) e radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), e outras espécies moleculares, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Dessa forma, todo radical livre é uma espécie reativa (RS), mas nem toda RS é um radical livre (Miller, Buettner et al. 1990, Halliwell 2007).

A principal fonte de radicais livres é a redução do oxigênio molecular à água, e em condições fisiológicas, o radical livre de oxigênio mais comum é o ânion superóxido  $O_2^{\cdot-}$ . A transferência de elétrons ao longo dos complexos da cadeia respiratória não é totalmente eficiente, e o vazamento de elétrons—em particular dos complexos I e III—resulta na formação de  $O_2^{\cdot-}$ . A taxa de formação é determinada pelo número de elétrons presentes na cadeia e, portanto, é elevada sob condições de hiperóxia e de aumento de glicose, como no diabetes. Paradoxalmente, ele também é aumentado sob condições de hipóxia, quando a reduzida disponibilidade de oxigênio para atuar como o aceptor de elétrons final para o complexo IV faz com que os elétrons se acumulem. Em condições normais, 2% do oxigênio consumido é convertido em  $O_2^{\cdot-}$  nas mitocôndrias, em vez de ser reduzido a água. Devido à sua carga, o  $O_2^{\cdot-}$  não se difunde através da membrana e, portanto, permanece dentro da matriz mitocondrial. O  $O_2^{\cdot-}$  pode reagir com  $H_2O_2$ , formando  $\cdot OH$  (reação de Haber-Weiss), também gerado pela reação entre  $H_2O_2$  e metais de transição como o ferro e o cobre (reação de Fenton), a partir de  $ONOO^-$ , ou irradiação de alta energia. O  $H_2O_2$  é formado em praticamente todos os tecidos do organismo e, apesar de fracamente reativo, sua importância está relacionada à sua capacidade de formar o  $\cdot OH$ . Já o  $NO^{\cdot}$  é um radical pouco reativo que apresenta grande importância biológica atuando na vasorregulação e neurotransmissão, mas em excesso pode ser tóxico. A reação entre os radicais  $NO^{\cdot}$  e  $O_2^{\cdot-}$  leva a formação de  $ONOO^-$ , o qual apresenta maior reatividade podendo oxidar lipídios, DNA e aminoácidos (Halliwell 2007).



Radicais livres e espécies não radicais reativas derivadas de radicais existem em células e tecidos biológicos em concentrações baixas, mas mensuráveis. Embora as ROS e RNS tenham primeiro sido tratadas apenas como subprodutos do metabolismo aeróbico potencialmente prejudiciais (Harman 1956, Harman 1981), hoje se reconhece que elas desempenham papéis importantes como segundos-mensageiros em muitas vias de sinalização intracelular (Circu and Aw 2010). O termo *sinalização redox* é utilizado para descrever processos regulatórios em que a sinalização ocorre através de espécies reativas. A sinalização redox é usada por uma ampla gama de organismos, incluindo bactérias, para induzir respostas protetoras contra danos oxidativos e para redefinir o estado original da homeostase redox após exposição temporária a ROS (Droge 2002). Com base nisso, a definição de estresse oxidativo tem sido revisada para incluir termos como *oxidative eustress* e *oxidative distress*.

*Oxidative eustress* refere-se a um desafio oxidativo fisiológico em que o  $H_2O_2$  é utilizado na sinalização adaptativa ou reguladora. Neste contexto, as ROS celulares, como  $H_2O_2$ , são utilizadas na oxidação de resíduos em proteínas para modular programas genômicos, transcricionais e metabólicos em resposta a mudanças no ambiente (Go, Chandler et al. 2015). Assim, o *oxidative eustress*, também conhecido como interface redox, permite a adaptação celular em resposta a mudanças no ambiente intracelular e extracelular (Jones and Sies 2015). *Oxidative distress*, por outro lado, está associado à superprodução de RS, podendo causar danos oxidativos às biomoléculas (proteínas, lipídios, carboidratos e DNA) e indução de apoptose (Sies, Berndt et al. 2017). Ao contrário do *oxidative eustress*, a oxidação de proteínas é irreversível, culminando com disfunção celular e morte. O paradoxo do oxigênio molecular foi cunhado para definir a relação recíproca que os mamíferos têm com o  $O_2$ ; é vital para a respiração aeróbica, mas os subprodutos associados ao seu uso são agentes causadores de doenças (Davies 2016).

### 1.6.2. Defesas antioxidantes

Halliwell e Gutteridge (Halliwell and Gutteridge 1989) definiram antioxidantes como substâncias que são capazes, em concentrações relativamente baixas, de competir com outros substratos oxidáveis e, assim, atrasar significativamente ou inibir a oxidação destes substratos. Esta definição inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), bem como compostos não enzimáticos, como  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno, ascorbato (vitamina C), e glutathiona reduzida (GSH). O modo de ação dos antioxidantes não-enzimáticos abrange a remoção direta do oxigênio e o sequestro das RS ou de seus precursores já presentes no organismo, bem como a prevenção da formação de novas RS (Halliwell 1994).

Todas as defesas enzimáticas têm um metal de transição no núcleo, capazes de assumir diferentes valências à medida que transferem elétrons durante o processo de detoxificação. Duas isoformas de SOD convertem  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$ , a forma contendo manganês, que é restrita às mitocôndrias, e a forma contendo cobre e zinco, que está localizada no citosol. O  $H_2O_2$  é então decomposto em água pelas ações da CAT ou GPx. A CAT, presente principalmente nos peroxissomos, reduz o  $H_2O_2$  a  $H_2O$  prevenindo a formação de  $\cdot OH$ . A atividade da GPx depende da presença de GSH como doador de hidrogênio.

A GSH é abundante no citosol (1 a 11 mM), núcleo (3 a 15 mM) e mitocôndrias (5 a 11 mM) e é o principal antioxidante solúvel nesses compartimentos celulares. É a principal defesa antioxidante não enzimática nas células e é sintetizada no citosol a partir de L-glutamato, L-cisteína e glicina. A GSH participa em um grande número de reações detoxificantes formando dissulfeto de glutathiona (GSSG), que é convertido de volta a GSH pela ação da glutathiona redutase às custas do NADPH. Este último é gerado através da via das pentoses-fosfato, da qual a glicose-6-fosfato desidrogenase é a primeira enzima (Halliwell 2007). A função do par redox GSH/GSSG na homeostase redox celular ocorre em conjunto com proteínas redox. As tiorredoxinas (Trxs) são pequenas proteínas ubíquas que possuem duas cisteínas no sítio

catalítico. As Trxs catalisam a redução reversível de ligações dissulfeto de proteínas, e as cisteínas do sítio ativo da Trx são regeneradas pela Trx redutase e NADPH (Nakamura, Nakamura et al. 1997). O NADPH, com um potencial redox de ~400 mV, é o doador de elétrons na recuperação do estado redox de GSH e Trx.

A relevância dos nucleotídeos de piridina, que compreendem a nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida e oxidada (NADH/NAD<sup>+</sup>) e a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida e oxidada (NADPH/ NADP<sup>+</sup>), classicamente associadas à produção de ATP e à biossíntese redutiva, respectivamente, na defesa antioxidante, é ressaltada por estudos demonstrando que durante o dano oxidativo o fluxo de substrato é canalizado da produção de NADH para o aumento da geração de NADPH. De fato, a atividade da via das pentoses é aumentada rapidamente quando as células são expostas a um oxidante (Stincone, Prigione et al. 2015). Para induzir essa transição metabólica, mecanismos metabólicos e reguladores de genes cooperam. Nos primeiros segundos após um *burst* oxidativo, enzimas de glicólise, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Ralser, Wamelink et al. 2007) e piruvato cinase (PK) (Gruning, Du et al. 2014) são inativadas, causando um bloqueio na glicólise, enquanto o fluxo da via das pentoses continua. Esta resposta rápida dura entre alguns segundos a minutos, depois as respostas transcricionais assumem e mantêm uma maior atividade da via das pentoses através da regulação de enzimas e modificações pós-transducionais, incluindo aquelas que aumentam a atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase. Assim, o equilíbrio NADPH/NADP<sup>+</sup> também está ligado à defesa contra o estresse oxidativo e à regulação redox. Por outro lado, um desvio significativo de equivalentes redutores da produção de energia para geração de NADPH pode comprometer a integridade respiratória mitocondrial (Stincone, Prigione et al. 2015).

### 1.6.3. Estresse oxidativo na fenilcetonúria

Nas duas últimas décadas, estudos em pacientes e modelos animais vem consolidando o desequilíbrio redox como um dos processos fisiopatológicos responsáveis pelos danos

cerebrais decorrentes da toxicidade da Phe em concentrações acima da normalidade. A neurofisiopatologia da PKU parece estar intimamente relacionada ao estresse oxidativo, favorecendo o acúmulo de ROS e, com isso, prejudicando a função celular. Uma revisão da literatura sobre o estresse oxidativo na PKU encontra-se na Parte II desta Tese.

### 1.7. Metabolismo energético cerebral

As funções cognitivas superiores do cérebro humano derivam da expansão e aumento da densidade e complexidade do neocórtex através da evolução (Rakic 2009). As habilidades aprimoradas do cérebro humano para planejar comportamentos complexos, tomar decisões e processar contextos emocionais e sociais vieram com pesadas exigências de energia—cerca de 20% do oxigênio e 25% da glicose consumida pelo corpo humano são dedicados às funções cerebrais, apesar do cérebro representar apenas 2% da massa corporal total (Attwell and Laughlin 2001). A manutenção e restauração de gradientes iônicos dissipados por processos de sinalização pós-sinápticos e potenciais de ação, assim como a absorção e reciclagem de neurotransmissores, são os principais processos que contribuem para as altas necessidades energéticas do cérebro (Attwell and Laughlin 2001, Alle, Roth et al. 2009). Entre eles, os potenciais sinápticos, e não os potenciais de ação, parecem representar, de longe, o principal custo energético relacionado à manutenção da excitabilidade (Alle, Roth et al. 2009). As sinapses excitatórias predominam em grande parte na substância cinzenta—somente as glutamatérgicas representam pelo menos 80% das sinapses corticais—sugerindo que a neurotransmissão excitatória é responsável pela maior parte das necessidades de energia no nível cortical. Correspondentemente, estima-se que a neurotransmissão mediada por glutamato é responsável pela maior parte (~80%) da energia gasta na substância cinzenta (Sibson, Shen et al. 1998, Attwell and Laughlin 2001, Shulman, Rothman et al. 2004, Hyder, Patel et al. 2006),

destacando a estreita relação entre a atividade cerebral, a neurotransmissão glutamatérgica, as necessidades energéticas e a utilização de glicose.

Uma característica marcante do metabolismo energético do cérebro é o forte acoplamento existente entre a demanda de energia e o suprimento (refletido pela liberação de glicose e oxigênio da vasculatura). De fato, aumentos na atividade cerebral em resposta à execução de tarefas são invariavelmente acompanhados por mudanças no fluxo sanguíneo local e na utilização de glicose<sup>4</sup>. Essas relações íntimas constituem a base para técnicas funcionais de imagem cerebral que permitiram estudos de mapeamento funcional no cérebro. Entre eles, PET permite determinar a taxa metabólica cerebral de consumo de glicose, a taxa metabólica cerebral de consumo de oxigênio, ou o fluxo sanguíneo cerebral, enquanto ressonância magnética funcional (fMRI) mede principalmente a oxigenação cerebral e o volume sanguíneo (Magistretti and Pellerin 1996, Raichle and Mintun 2006, Figley and Stroman 2011).

#### 1.7.1. Rede de fosfotransferência

O funcionamento do sistema bioenergético celular requer que as fosforilas ricas em energia sejam produzidos e entregues a locais consumidores de energia na taxa correspondente à velocidade da ATPase, e que os produtos da hidrólise de ATP, ADP, Pi e H<sup>+</sup>, sejam removidos para evitar obstáculos cinéticos e termodinâmicos (van Deursen, Heerschap et al. 1993, Saks, Khuchua et al. 1994, Tian, Christie et al. 1997, Dzeja, Redfield et al. 2000). Redes enzimáticas espacialmente organizadas desempenham um papel essencial na comunicação energética intracelular. A rede de fosfotransferência, catalisada por enzimas como creatina cinase (CK), adenilato cinase (AK), hexocinase (HK), PK, e GAPDH, atua apoiando a transferência de fosforilas de alta energia e a sinalização entre os processos de geração e consumo de ATP (Wallimann, Wyss et al. 1992, Saks, Khuchua et al. 1994, Dzeja and Terzic 1998, Dzeja,

---

<sup>4</sup> Esses processos são referidos como acoplamento neuro vascular e neuro metabólico, respectivamente.

Zeleznikar et al. 1998, Joubert, Mazet et al. 2002). Este conceito dinâmico enfatiza que a sinalização metabólica através de redes enzimáticas, juntamente com outros mecanismos homeostáticos (Balaban 2002), contribui para a eficiente comunicação energética intracelular na manutenção do equilíbrio entre o consumo e produção celular de ATP (van Deursen, Heerschap et al. 1993, Saks, Khuchua et al. 1994, Dzeja, Redfield et al. 2000, Neumann, Schlattner et al. 2003).

### 1.7.2. Metabolismo energético e neurodegeneração

A maior parte dos estudos investigando as relações entre metabolismo energético e função cerebral se concentra em doenças neurodegenerativas, como Alzheimer (AD), mal de Parkinson (PD), e doença de Huntington (HD), descrevendo alterações do catabolismo da glicose através da glicólise e produção de equivalentes redutores no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), que alimenta a cadeia respiratória gerando ATP a partir do gradiente de prótons mitocondrial. Experimentos em culturas primárias de neurônios mostraram que a morte neuronal devido à excitotoxicidade<sup>5</sup> foi marcadamente estimulada pelo bloqueio subtóxico da produção de energia (Novelli, Reilly et al. 1988). Achados semelhantes em modelos animais levaram à hipótese de “excitotoxicidade indireta”, em que defeitos parciais de energia podem produzir morte celular progressiva (Beal 1992). Distúrbios do metabolismo energético foram observados in vivo em doenças neurodegenerativas usando PET para medir o consumo loco-regional de glicose através do emissor de pósitron [18F]-fluorodesoxiglicose. As reduções no consumo de glicose mais notáveis foram encontradas no corpo estriado de pacientes em HD e em algumas áreas do córtex cerebral em pacientes com AD (córtices parietotemporais, frontais e posteriores do cíngulo) (Novelli, Reilly et al. 1988). Essas alterações metabólicas têm sido

---

<sup>5</sup> Morte celular decorrente de cascata excitotóxica desencadeada por excesso de liberação de glutamato, superestimulação de receptores de glutamato ionotrópicos e extravasamento de Ca<sup>2+</sup>.

frequentemente interpretadas como consequência da redução da atividade sináptica e/ou da perda de neurônios.

Há também evidências de que as doenças neurodegenerativas estão associadas a comprometimento da função mitocondrial. Muitos estudos sugerem que os complexos da cadeia respiratória são afetados diferencialmente nos cérebros de pacientes e modelos animais, dependendo da doença e do seu estágio de progressão. Esses resultados podem ser influenciados por limitações técnicas (por exemplo, atraso pós-morte), mas indicam que as mitocôndrias podem ser afetadas precocemente nas doenças neurodegenerativas (Beal, Brouillet et al. 1993, Mutisya, Bowling et al. 1994, Brouillet, Hantraye et al. 1995, Bosetti, Brizzi et al. 2002, Bove, Prou et al. 2005, Valla, Yaari et al. 2010, Tanner, Kamel et al. 2011). No início dos anos 90, a “era da apoptose” estimulou a descoberta de funções mitocondriais cruciais no controle da sobrevivência celular (Hockenbery, Nunez et al. 1990, Hockenbery, Oltvai et al. 1993, Newmeyer, Farschon et al. 1994, Kluck, Bossy-Wetzl et al. 1997, Green and Reed 1998). Essas pesquisas levaram à observação de que, em alguns casos, a morte celular realmente requer energia—o apoptosoma só é ativo se os níveis de ATP forem suficientes (Li, Nijhawan et al. 1997). No entanto, o desencadeamento de vias apoptóticas perturba o potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) e reduz o gradiente de prótons transmembrana ( $\Delta\mu H^+$ ). A liberação do citocromo c finalmente anula o fluxo de elétrons na cadeia respiratória e aumenta a produção ROS, reforçando ainda mais a ideia de que as mitocôndrias e falhas de energia podem estar no centro das doenças neurodegenerativas (Lin and Beal 2006). Tais alterações associadas ao metabolismo energético não podem ser descartadas como possíveis distúrbios também presentes nos EIM que acarretam subdesenvolvimento cerebral e deficiência intelectual<sup>6</sup> aos pacientes.

---

<sup>6</sup> Consulte o Apêndice II para revisão sobre deficiência intelectual nos EIM.

### 1.7.3. Metabolismo energético cerebral na fenilcetonúria

Estudos em pacientes e modelos animais apontam que a Phe em concentrações acima da normalidade promove distúrbios da homeostase energética cerebral, sendo este um dos processos fisiopatológicos responsáveis pelos danos cerebrais decorrentes do acúmulo de Phe. Uma revisão da literatura sobre metabolismo energético cerebral na PKU encontra-se na Parte II desta Tese.

### 1.8. Interações entre metabolismo energético e estresse oxidativo

A fosforilação oxidativa é a principal fonte de ROS, geradas como subprodutos na cadeia de transporte de elétrons. De fato, 1-2% do O<sub>2</sub> consumido pela cadeia respiratória é desviado para gerar ROS, como O<sup>2-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, principalmente através dos complexos respiratórios I e III (Cadenas and Davies 2000). Assim, o estresse oxidativo e o metabolismo energético estão intimamente relacionados. Ao passo que as mitocôndrias proveem fosfatos de alta energia, a rede de fosfotransferência permite a comunicação entre os compartimentos celulares de consumo e produção de ATP, sendo funcionalmente acoplada à fosforilação oxidativa (Dzeja and Terzic 2003, Schlattner, Klaus et al. 2016). As enzimas da fosfotransferência também desempenham um papel antioxidante ao reciclar o ADP através da membrana mitocondrial interna. Como a taxa fisiológica de produção de ROS mitocondrial é inversamente proporcional à disponibilidade de ADP citosólico, a relação ADP/ATP é fundamental para a manutenção do  $\Delta\psi_m$  (100-150 mV) e do  $\Delta\mu H^+$  (Cadenas and Davies 2000).

O fato de que o risco de desenvolver uma doença neurodegenerativa aumenta com a idade também fornece evidências circunstanciais para o papel das mitocôndrias e do metabolismo energético. De fato, o envelhecimento normal está associado à disfunção mitocondrial e ao estresse oxidativo (Beal 1995). Um dos argumentos mais convincentes é que há um acúmulo progressivo, dependente da idade, de marcadores moleculares de estresse



oxidativo no DNA mitocondrial e nuclear no cérebro humano, levando a defeitos relativamente seletivos na expressão de genes relacionados ao metabolismo energético (Lu, Pan et al. 2004). Essas alterações (juntamente com outras que estão ligadas à proteostase, reparo do DNA e autofagia) podem tornar os neurônios e astrócitos particularmente vulneráveis a processos patológicos no cérebro envelhecido (Haigis and Yankner 2010). Dados recentes da genética humana indicam que, em muitos casos, as doenças neurodegenerativas de origem genética (isto é, familiares) são causadas por mutações em genes que codificam proteínas localizadas em mitocôndrias e/ou proteínas nas quais as mutações controlam indiretamente as funções mitocondriais (Song, Chen et al. 2011, Corti and Brice 2013, de Vries and Przedborski 2013).

#### 1.8.1. Antioxidantes, suplementos energéticos e função cognitiva

Nas últimas quatro ou cinco décadas, tem havido um crescente interesse na regulação neuroquímica da cognição. Este campo recebeu considerável atenção na década de 1980, com a identificação de possíveis agentes promotores da cognição ou “drogas inteligentes”. Embora muitas das afirmações otimistas de alguns agentes tenham se provado prematuras, as evidências sugerem que vários agentes metabólicos podem se mostrar eficazes em melhorar e preservar o desempenho cognitivo. Alguns desses agentes podem atuar como substratos energéticos, ao mesmo tempo em que oferecem proteção antioxidante (Owen and Sunram-Lea 2011). Nesse contexto, e considerando as complicações neurológicas da PKU e seu impacto nos processos relacionados à cognição e comportamento, neste trabalho abordaremos a creatina e o piruvato.

##### 1.8.1.1. Creatina

A creatina (Cr) é um aminoácido de ocorrência natural encontrado em vertebrados, que participa de reações metabólicas dentro das células e é catabolizada à creatinina, a qual é a seguir excretada pelos rins na urina. O estoque de Cr em um adulto padrão de 70 kg é de aproximadamente 120 g, com um *turnover* diário de 1,6% (Balsom, Soderlund et al. 1995). A

necessidade diária deste aminoácido é estimada em 2 g/dia (Walker 1979). A Cr é obtida na dieta através da carne vermelha e de peixe, o que se torna um problema em dietas vegetarianas e veganas, ou outras dietas restritas em proteína, o que é o caso da restrição de Phe nas dietas para pacientes PKU, que eliminam fontes naturais de proteínas no intuito de minimizar a ingestão de Phe e, colateralmente, diminuem a ingestão de Cr (Singh, Cunningham et al. 2016).

O principal e mais reconhecido papel da Cr é como acceptor de fosfatos de alta energia na reação catalisada pela CK: Creatina + ATP  $\leftrightarrow$  Fosfocreatina + ADP + H<sup>+</sup>. A fosfocreatina (PCr), através da reação catalisada pela CK, atua conjuntamente com uma série de reações que demandam e produzem ATP como um tampão para a ligação de fosfatos de alta energia. A ligação de fosfato de alta energia na PCr tem uma energia livre de hidrólise mais alta do que aquela encontrada no ATP ( $\Delta G^{\circ}$  kJ/mol = -45,0 cf; -31,8, respectivamente) (Wyss and Kaddurah-Daouk 2000), além de ser uma molécula menor e menos carregada negativamente, o que agiliza sua difusão para locais com demanda de energia. A CK faz a interconversão de PCr em Cr prontamente, numa reação que regenera ATP a uma taxa 40x mais rápida que a fosforilação oxidativa e 10x mais rápida que a glicólise (Wallimann, Wyss et al. 1992). Assim, a PCr atua como um banco de energia, possibilitando às células “esconder” ATP de fácil acesso.

Diversos estudos demonstram um papel neuroprotetor da Cr em modelos animais de doenças neurológicas e neurodegenerativas, sendo particularmente importante na função e desenvolvimento cerebral (Wyss, Braissant et al. 2007). Além disso, seres humanos mostraram um melhor desempenho cognitivo após suplementação com Cr (Watanabe, Kato et al. 2002, McMorris, Harris et al. 2006, McMorris, Harris et al. 2007, Ling, Kritikos et al. 2009).

#### 1.8.1.2. Piruvato

O piruvato (Pyr) é o produto final da glicólise, a seguir convertido em acetil CoA que entra no TCA quando há oxigênio suficiente disponível. A barreira hematoencefálica normalmente transporta Pyr a uma taxa muito mais lenta que glicose, mas estudos sugerem que

a entrada de Pyr para o cérebro pode ser aumentada significativamente elevando-se as concentrações de Pyr (Lee, Kim et al. 2001).

A maior parte dos estudos mostrando neuroproteção com Pyr envolve modelos ou situações de privação de glicose e hipóxia (Ying, Chen et al. 2002, Suh, Aoyama et al. 2005, Yu, Kim et al. 2005), objetivando um resgate energético da cascata excitotóxica decorrente desses episódios (Wieloch 1985). Estudos em outros modelos são escassos, e são necessários mais estudos com a utilização desse substrato em outras condições que apresentam distúrbios da homeostase energética. Em nossos trabalhos, vimos que a combinação Cr+Pyr preveniu a redução de espinhos dendríticos em ambiente celular de alta concentração de Phe, sugerindo que a perturbação da homeostase energética é um dos fatores que levam ao mau desenvolvimento cerebral/cognitivo apresentado na PKU (Dos Reis, Rieger et al. 2013). Adicionalmente, em estudo de proles de ratas hiperfenilalaninêmicas, o cotratamento com Cr e Pyr preveniu a diminuição na atividade das enzimas CK (citosólica e mitocondrial) e AK, além de prevenir a redução de peso do córtex cerebral e hipocampo (Bortoluzzi, de Franceschi et al. 2014). Estes resultados podem estar relacionados com a constatação *in vivo* de metabolismo energético cerebral reduzido em pacientes PKU (Pietz, Rupp et al. 2003).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos gerais

Este trabalho busca corroborar com o esclarecimento dos mecanismos através dos quais o acúmulo de um aminoácido, neste caso Phe, é capaz de prejudicar o desenvolvimento do SNC. Neste estudo, pretendeu-se investigar o estresse oxidativo e sua concomitância com perturbações da homeostase energética na fisiopatologia da PKU em modelo da doença induzido quimicamente em ratos Wistar. Também foi avaliado o comportamento dos animais submetidos aos tratamentos, e se uma suplementação com Cr e Pyr oferece proteção frente aos parâmetros possivelmente alterados.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de 7 e 14 dias de injeções subcutâneas de Phe (duas vezes ao dia) e  $\alpha$ MePhe (uma vez ao dia), como modelo de PKU sobre parâmetros gerais de estresse oxidativo, e o efeito do tratamento com Cr+Pyr (duas vezes ao dia) como antioxidante em córtex cerebral, hipocampo e cerebelo;
- avaliar se os tratamentos produzem alterações de homeostase energética e o desempenho do cotratamento com Cr+Pyr em prevenir essas alterações, quando presentes;
- avaliar o efeito dos tratamentos sobre o comportamento dos animais em campo aberto, e coordenação motora no rota-rod.

**PARTE II**

### 3. REVISÃO DA LITERATURA CIENTÍFICA

#### Capítulo I – Artigo I

#### OXIDATIVE STRESS IN PHENYLKETONURIA

*Vanessa Trindade Bortoluzzi, Carlos Severo Dutra Filho, Clovis Milton Duval Wannmacher*

*Artigo sob revisão para segunda submissão<sup>7</sup>*

---

<sup>7</sup> Veja Anexo III para resposta da primeira submissão à revista Molecular Genetics and Metabolism.

Capítulo II – Artigo II

BRAIN ENERGY METABOLISM IN PHENYLKETONURIA

*Vanessa Trindade Bortoluzzi, Clovis Milton Duval Wannmacher*

*Artigo a ser submetido ao periódico Neurochemical Research*

#### **4. MATERIAS E MÉTODOS**

A parte experimental deste trabalho, desde o tratamento dos animais, ensaios bioquímicos, testes comportamentais e análise estatística, encontra-se nas sessões de materiais e métodos dos artigos de resultados.



## 5. RESULTADOS

### Capítulo III – Artigo III

CREATINE PLUS PYRUVATE SUPPLEMENTATION PREVENTS OXIDATIVE  
STRESS AND PHOSPHOTRANSFER NETWORK DISTURBANCES IN THE BRAIN OF  
RATS SUBJECTED TO CHEMICALLY-INDUCED PHENYLKETONURIA

*Vanessa Trindade Bortoluzzi, Leticia Brust, Thales Preissler, Itiane Diehl de Franceschi,*

*Clovis Milton Duval Wannmacher*

*Artigo publicado no periódico Metabolic Brain Disease*

## Metabolic Brain Disease

### Creatine plus pyruvate supplementation prevents oxidative stress and phosphotransfer network disturbances in the brain of rats subjected to chemically-induced phenylketonuria --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	MEBR-D-19-00192R1
<b>Full Title:</b>	Creatine plus pyruvate supplementation prevents oxidative stress and phosphotransfer network disturbances in the brain of rats subjected to chemically-induced phenylketonuria
<b>Article Type:</b>	Original Article
<b>Keywords:</b>	Phenylketonuria; Oxidative stress; brain energy metabolism; phosphotransfer network; creatine and pyruvate; inborn error of metabolism.
<b>Corresponding Author:</b>	Vanessa Trindade Bortoluzzi, MSc Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre, Rio Grande do Sul BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Vanessa Trindade Bortoluzzi, MSc
<b>Order of Authors:</b>	Vanessa Trindade Bortoluzzi, MSc Leticia Brust Thales Preissler Itiane Diehl de Franceschi Clovis Milton Duval Wannmacher
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Funding Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	Phenylketonuria (PKU) is the most common inborn error of amino acid metabolism. Usually diagnosed within the first month of birth, it is essential that the patient strictly follow the dietary restriction of natural protein intake. Otherwise, PKU impacts the development of the brain severely and may result in microcephaly, epilepsy, motor deficits, intellectual disability, and psychiatric and behavioral disorders. The neuropathology associated with PKU includes defects of myelination, insufficient synthesis of monoamine neurotransmitters, amino acid imbalance across the blood-brain barrier, and involves intermediary metabolic pathways supporting energy homeostasis and antioxidant defenses in the brain. Considering that the production of reactive oxygen species (ROS) is inherent to energy metabolism, we investigated the association of creatine+pyruvate (Cr+Pyr), both energy substrates with antioxidants properties, as a possible treatment to mitigate oxidative stress and phosphotransfer network impairment elicited in the brain of young Wistar rats by chemically-induced PKU. We induced PKU through the administration of $\alpha$ -methyl-L-phenylalanine and phenylalanine for 7 days, with and without Cr+Pyr supplementation, until postpartum day 14. The cotreatment with Cr+Pyr administered concurrently with PKU induction prevented ROS formation and part of the alterations observed in antioxidants defenses and phosphotransfer network enzymes in the cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum. If such prevention also occurs in PKU patients, supplementing the phenylalanine-restricted diet with antioxidants and energetic substrates might be beneficial to these patients.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

**Creatine plus pyruvate supplementation prevents oxidative stress and  
phosphotransfer network disturbances in the brain of rats subjected to chemically-  
induced phenylketonuria**

23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

Vanessa Trindade Bortoluzzi, Leticia Brust, Thales Preissler, Itiane Diehl de Franceschi, Clovis Milton Duval Wannmacher

30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2600, CEP 90.035-003, RS, Brazil

40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Corresponding author:** Vanessa Trindade Bortoluzzi, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica. Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo - Porto Alegre – RS, Brasil, 90035-003.

ORCID ID: 0000-0003-2993-1266

Tel: +55 51 3308-5576; Cel: +55 51 99213-0018 E-mail: vbortoluzzi@gmail.com

**ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors express their gratitude to the Department of Biochemistry, and the Basic Health Sciences Institute of the Federal University of Rio Grande do Sul, especially to the people responsible for animal care. We also thank the funding agencies that supported the present study – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) Rede Instituto Brasileiro de Neurociência.

## ABSTRACT

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Phenylketonuria (PKU) is the most common inborn error of amino acid metabolism. Usually diagnosed within the first month of birth, it is essential that the patient strictly follow the dietary restriction of natural protein intake. Otherwise, PKU impacts the development of the brain severely and may result in microcephaly, epilepsy, motor deficits, intellectual disability, and psychiatric and behavioral disorders. The neuropathology associated with PKU includes defects of myelination, insufficient synthesis of monoamine neurotransmitters, amino acid imbalance across the blood-brain barrier, and involves intermediary metabolic pathways supporting energy homeostasis and antioxidant defenses in the brain. Considering that the production of reactive oxygen species (ROS) is inherent to energy metabolism, we investigated the association of creatine+pyruvate (Cr+Pyr), both energy substrates with antioxidants properties, as a possible treatment to mitigate oxidative stress and phosphotransfer network impairment elicited in the brain of young Wistar rats by chemically-induced PKU. We induced PKU through the administration of  $\alpha$ -methyl-L-phenylalanine and phenylalanine for 7 days, with and without Cr+Pyr supplementation, until postpartum day 14. The cotreatment with Cr+Pyr administered concurrently with PKU induction prevented ROS formation and part of the alterations observed in antioxidants defenses and phosphotransfer network enzymes in the cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum. **If such prevention also occurs in PKU patients, supplementing the phenylalanine-restricted diet with antioxidants and energetic substrates might be beneficial to these patients.**

**Key terms:** Phenylketonuria; oxidative stress; brain energy metabolism; phosphotransfer network; creatine and pyruvate; inborn error of metabolism.

**Abbreviations:** PKU, phenylketonuria; IEM, inborn error of metabolism; PAH, phenylalanine hydroxylase; Phe, phenylalanine; HPA, hyperphenylalaninemia; ROS, reactive oxygen species; Cr, creatine; Pyr, pyruvate;  $\alpha$ MePhe,  $\alpha$ -methyl-L-phenylalanine; DCFH, 2',7'-dihydrodichlorofluorescein; SH, Sulfhydryl groups; GSH, reduced glutathione; CAT, catalase; SOD, superoxide dismutase, GPx, glutathione peroxidase; CytCK, cytosolic creatine kinase; MtCK, mitochondrial creatine kinase; PCr, phosphocreatine; PK, pyruvate kinase; HK, hexokinase; AK, adenylate kinase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; OXPHOS, oxidative phosphorylation.

## 1. INTRODUCTION

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Phenylketonuria (PKU) is an inborn error of metabolism (IEM) caused by mutations in the gene that encodes the enzyme phenylalanine hydroxylase (PAH) (Blau 2016). The enzyme synthesized, then, is unable to hydroxylate phenylalanine (Phe) into tyrosine, leading to Phe accumulation in blood and other tissues, impairing the overall development of the patient, remarkably the development of the brain (Scriver 1995, Kayaalp, Treacy et al. 1997). The most common clinical finds include intellectual disability, epilepsy, motor deficits, and behavioral disturbances, among other neurological and psychiatric symptoms (Gonzalez, Gutierrez et al. 2011, Bilder, Burton et al. 2013, Bilder, Noel et al. 2016). The defects of myelination are a striking feature observed in the central nervous system of PKU patients (Anderson and Leuzzi 2010), alongside with reduced synthesis of monoamine neurotransmitters (Surtees and Blau 2000), amino acid imbalance across the blood-brain barrier (de Groot, Hoeksma et al. 2013), and reduced glutamatergic transmission (Martynyuk, Glushakov et al. 2005). Moreover, PKU disturbs metabolic pathways involved in energy homeostasis and oxidative balance (Schuck, Malgarin et al. 2015).

Oxidative stress has gained acceptance as a disturbance implicated in the pathogenesis of PKU; there is evidence of oxidative damage in blood cells of patients, in the brain of animal models of PKU, and from in vitro experiments (Sirtori, Dutra-Filho et al. 2005, Ribas, Sitta et al. 2011, Sanayama, Nagasaka et al. 2011, Veyrat-Durebex, Debeissat et al. 2017, Rausell, García-Blanco et al. 2019). Consistently, in previous work we observed oxidative stress in the brain of rats subjected to a hyperphenylalaninemia (HPA) model (Kienzle Hagen, Pederzoli et al. 2002, Moraes, Jacques et al. 2013), and that Phe induced enhancement in catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx) activities in cortical astrocytes, as well as decreased the reduced glutathione (GSH) content and increased the production of reactive oxygen species (ROS) (Preissler, Bristot et al. 2016). **HPA may also impair the activity of the mitochondrial electron transport chain (Stepien, Heaton et al. 2017). In a chronic model, HPA decreased succinate dehydrogenase and respiratory chain complexes I + III activities in rat cerebral cortex (Rech, Feksa et al. 2002). Further, in a recent study, Dimmer et al. showed decreased complexes I + III and IV activities in cerebral cortex and hippocampus of rats subjected to acute HPA (Dimer, Ferreira et al.**

2018), suggesting mitochondrial dysfunction might occur even in isolated episodes of Phe elevation.

While mitochondria provide high-energy phosphates, the phosphotransfer network allows the communication between cellular sites of ATP consumption and production, being functionally coupled to oxidative phosphorylation (OXPHOS) (Dzeja and Terzic 2003, Schlattner, Klaus et al. 2016). Phosphotransfer enzymes also play an antioxidant role by recycling ADP through the inner mitochondrial membrane. As the physiological rate of mitochondrial ROS production is inversely proportional to the availability of cytosolic ADP (Cadenas and Davies 2000), the ADP/ATP ratio is fundamental to keep low mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) (100-150 mV) and maintains the proton gradient across the membrane ( $\Delta\mu_{H^+}$ ). We have reported that Phe disturbs the activity of enzymes involved in keeping the ADP/ATP homeostasis, such as creatine kinase (CK) and pyruvate kinase (PK), in vitro and in the cerebral cortex of rats subjected to PKU (Feksa, Cornelio et al. 2002, Costabeber, Kessler et al. 2003, Feksa, Cornelio et al. 2003).

The treatment of PKU consists of a Phe-restricted diet, accompanied by a Phe-free medical formula, to prevent Phe accumulation in blood (van Wegberg, MacDonald et al. 2017). Although efficient in lowering Phe levels, this diet allows very restrict intake of natural protein, compromising the patient's compliance with the treatment, especially during adolescence when parental control over the diet weakens (MacDonald, Gokmen-Ozel et al. 2010). Considering the interplay between energy conversions and the generation of ROS, we propose an approach with creatine and pyruvate (Cr+Pyr), substrates that offer both energy support and antioxidant protection, as possible adjuvant treatment. Cr+Pyr prevented lipid peroxidation and damage to sulfhydryl groups elicited by intra-hippocampal administration of Phe, ameliorating total radical-trapping antioxidant potential and total antioxidant reactivity (Berti, Nasi et al. 2012), and prevented disturbances in the activity of enzymes from the phosphotransfer network in cerebral cortex and hippocampus in the offspring of rats subjected to a maternal model of PKU (Bortoluzzi, de Franceschi et al. 2014). Further, the treatment with Cr+Pyr was able to prevent the reduction in dendritic spine density in the stratum radiatum of the CA1 hippocampal field and the posterodorsal medial amygdala of PKU rats (Dos Reis, Rieger et al. 2013).

In the present study, we aimed to evaluate the concomitance of oxidative stress and disturbs of energy homeostasis in the brain of young Wistar rats subjected to a

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

chemical model of PKU, and the effect of a cotreatment with Cr+Pyr concurrently with PKU induction. Tested parameters include enzymatic and no enzymatic antioxidant defenses, as well as ROS production, and the activity of phosphotransfer enzymes, in the cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum of the pups. Furthermore, we investigated if the treatments affected brain mass and if there is a relation between oxidative stress and the activity of enzymes from the phosphotransfer network.

## 2. MATERIAL & METHODS

### 2.1. Chemicals

All reagents used were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), except salts for buffer solutions, which were of analytical grade and were purchased from local suppliers.

### 2.2. Animals

Forty-eight Wistar rats obtained from the Department of Biochemistry of Federal University Federal of Rio Grande do Sul were used in the experiments (twenty-four rats for each set of parameters analyzed, oxidative stress and phosphoryl transfer network). Pups were bred with their mothers, housed as 6 litters with 8 pups each, and kept in the department's vivarium on a 12–12 h light/dark cycle in a room acclimatized at constant temperature ( $22 \pm 1$  °C), with water and commercial chow (Supra, Porto Alegre, RS, Brazil) ad libitum. The Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, approved the experimental protocol (project number 29388). The “Principles of laboratory animal care” (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH publication n°. 80–23, revised 1996; <http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/>) were followed. All efforts were made to minimize animal suffering, using only the number of animals necessary to produce reliable scientific data.

### 2.3. Treatments

Pups were divided into four groups with 6 animals each, in a manner that each pup in a given group was from a distinct litter. Groups were: 1) saline (Sal); 2) phenylketonuria (PKU): phenylalanine 5,2  $\mu\text{mol}$  per g of body weight (Feksa, Cornelio et al. 2002) +  $\alpha$ -methyl-L-phenylalanine ( $\alpha\text{MePhe}$ ) 1.6  $\mu\text{mol}$  per g of body weight

1 (Kienzle Hagen, Pederzolli et al. 2002); 3) creatine 0.4 mg per g of body weight  
2 (Stockler, Holzbach et al. 1994) + pyruvate 0.2 mg per g of body weight (Ryu, Choi et  
3 al. 2006); and 4) PKU+Cr+Pyr. Saline was the vehicle for all the solutions. The  
4 volumes used were 10 µl per g of body weight for Cr+Pyr and the PAH inhibitor  
5 αMePhe, and 30 µl per g of body weight for L-Phe. Pups received twice a day at 10-12  
6 h interval subcutaneous administration of L-Phe or saline and intraperitoneal  
7 administration of Cr+Pyr or saline. αMePhe was administered intraperitoneally once a  
8 day to PKU and PKU+Cr+Pyr groups, by the morning. L-Phe, αMePhe, Cr+Pyr, and  
9 saline solutions were buffered to pH 7.4 immediately before the administration.  
10 Animals were treated from postpartum day 7 (P7) until postpartum day 14 (P14), and  
11 sacrificed without anesthesia 12 hours after the last routine of treatment, on postpartum  
12 day 15 (P15).  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

#### 23 **2.4. Tissue Dissection**

24 Brains were removed from the skull using the foramen magnum as the lower  
25 limit and rapidly dissected free of meninges and superficial blood vessels. Brains were  
26 dissected in 3 regions of interest: cerebellum, cerebral cortex, and hippocampus, using  
27 consistent anatomical landmarks as criteria for dissection. The cerebellum was dissected  
28 by cutting the cerebellar peduncles at the surface of the brainstem; the cerebral cortex  
29 comprised all regions from dorsolateral to the olfactory tract, excluding the  
30 hippocampus, and was dissected from each hemisphere by peeling it away from the  
31 striatum and other subcortical structures under a stereomicroscope. The weight of the  
32 whole brain and each structure of interest were recorded for subsequent  
33 homogenization.  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44

#### 45 **2.4.1. Tissue Homogenization**

46 Tissues were homogenized in 10 volumes (1:10 w/v) of buffer solution  
47 phosphate-KCl (20/40 mM) pH 7.4 for analysis of oxidative stress parameters, and SET  
48 buffer (0.32 M sucrose/1 mM EGTA/10 mM Tris-HCl) pH 7.4 for analysis of energy  
49 metabolism parameters. Homogenates were centrifuged at 800×g for 10 min at 4 °C for  
50 evaluation of oxidative stress parameters and hexokinase (HK), glyceraldehyde-3-  
51 phosphate dehydrogenase (GAPDH) and adenylate kinase (AK) activities. Pellets were  
52 discarded, and part of the supernatant from samples homogenized in the SET buffer  
53 went through second centrifugation at 10,000×g for 15 min at 4 °C, resulting in a  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

supernatant containing cytosol and other cellular components, such as endoplasmic reticulum. This supernatant was collected for determination of pyruvate kinase (PK) and cytosolic creatine kinase (CytCK) activity, and the pellet containing mitochondria, myelin, synaptosomes, and membrane fragments, was resuspended in the same SET buffer, centrifugated at 10,000×g for 15 min at 4 °C, and resuspended in 100 mM Trizma/ 15 Mm MgSO4 buffer, pH 7.5, for determination of mitochondrial creatine kinase (MtCK) activity. All the supernatants were stored for no more than one week at -80 °C when assays were not carried out immediately.

## **2.5. Oxidative Stress Parameters**

### **2.5.1. 2',7'-Dihydrodichlorofluorescein Oxidation Assay**

ROS production was measured using LeBel's method (LeBel, Ischiropoulos et al. 1992). Samples were incubated for 30 min at 37 °C in the dark with 20 mM sodium phosphate buffer with 140 mM KCl pH 7.4 and 100 μM reduced 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DCF-DA) solution. H2DCF-DA is cleaved by cellular esterases to H2DCF, which is oxidized to DCF by reactive oxygen species (ROS) present in samples. DCF fluorescence intensity parallels to the number of reactive species formed. Fluorescence was measured using excitation of 480 nm and emission of 535 nm wavelengths. A calibration curve was prepared with standard DCF (0.25–10 μM), and the levels of reactive species were expressed as nanomoles of DCF formed per milligram of protein.

### **2.5.2. Total Sulphydryl Content**

Sulphydryl content (SH) was assessed through Aksenov's method (Aksenov and Markesbery 2001), which consists in the reduction of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, producing a yellow derivative (TNB) with absorption measured spectrophotometrically at 412 nm. Briefly, 0.1 mM DTNB was added to 120 μl of cortex cerebral, hippocampus and cerebellum supernatants, followed by a 30-min incubation at room temperature, protected from light. Sulphydryl content inversely correlates to oxidative damage to proteins but also reflects reduced glutathione (GSH) and other thiols levels. Results were expressed as nanomoles of TNB per milligram of protein.

### **2.5.3. Reduced glutathione content**

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

GSH content was evaluated according to Browne and Armstrong (Browne and Armstrong 1998), whose method consists of the reaction of GSH with the fluorophore o-phthalaldehyde (OPT) after the deproteinization of the sample with metaphosphoric acid. Then, 150  $\mu$ L of the samples were incubated with an equal volume of o-phthalaldehyde (1 mg/ml of methanol) for 15 min at 37°C. Immediately following the incubation, fluorescence was measured using excitation of 350 nm and emission of 420 nm wavelengths. A calibration curve was prepared with standard GSH (1 mM), and results were expressed as nmol of GSH per mg of protein.

#### 2.5.4. Catalase

CAT activity was assayed according to Aebi (Aebi 1984) by measuring the absorbance decrease of  $H_2O_2$  at 240 nm. Reaction medium contained 20 mM  $H_2O_2$ , 0.1% Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0 and 10  $\mu$ l of the supernatants. CAT is responsible for the transformation of  $H_2O_2$  in  $H_2O$ . Hydrogen peroxide can react with thiol and methionyl groups of enzymes and other proteins, and form high reactive hydroxyl radicals. One CAT unit is defined as 1  $\mu$ mol of hydrogen peroxide consumed/min, and the specific activity was calculated as CAT units per mg of protein.

#### 2.5.5. Superoxide Dismutase

SOD is involved in transforming superoxide free radicals in hydrogen peroxide, a less reactive substance. SOD activity was evaluated using Marklund's method (Marklund and Marklund 1974). Pyrogallol is highly sensitive to the superoxide radical, and the activity of SOD is directly proportional to the inhibition of the pyrogallol autoxidation. SOD activity was indirectly assessed spectrophotometrically at 420 nm. A calibration curve with purified SOD was used as standard. One unit of SOD corresponds to 50% inhibition of pyrogallol autoxidation. The specific activity of SOD was expressed as units per milligram of protein.

#### 2.5.6. Glutathione Peroxidase

GPx activity was measured following Wendel's method (Wendel 1981), which uses tert-butyl hydroperoxide as substrate. NADPH disappearance was continuously monitored in a spectrophotometer at 340 nm for 4 min. One GPx unit is defined as 1

mmol of NADPH consumed per minute, and the specific activity was reported as units of GPx per milligram of protein.

## 2.6. Phosphoryl Transfer Network

### 2.6.1. Mitochondrial and Cytosolic Creatine Kinase

Mitochondrial (MtCK) and cytosolic (CytCK) CK activity were assayed in a mixture containing the following final concentrations: 65 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 7 mM phosphocreatine, 9 mM MgSO<sub>4</sub>, and 1 µg of protein (cytosolic or mitochondrial-rich fraction) in a final volume of 0.1 ml. After 10 minutes of pre-incubation at 37 °C, the reaction was started by with 0.3 µmol of ADP, and the addition of 1 µmol of p-hydroxymercuribenzoic acid stopped it after 10 minutes. Reagent concentrations and the incubation time were chosen to assure linearity of the enzymatic activity. Appropriate controls were carried out to measure the chemical hydrolysis of phosphocreatine. The creatine formed was estimated according to the colorimetric method of Hughes (Hughes 1962). The color develops 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 in a spectrophotometer. Results were expressed as µmol of creatine formed per min per mg of protein.

### 2.6.2. Pyruvate kinase

PK activity was assayed as described by Leong (Leong, Lai et al. 1981). The incubation medium consists of 0.1 M Tris/HCl buffer, pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 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 minutes of pre-incubation at 37 °C, the addition of 1 mM phosphoenolpyruvate started the reaction, which was measured at 340 nm for 2 minutes in a spectrophotometer. Results were expressed as µmol of pyruvate formed per min per mg of protein.

### 2.6.3. Hexokinase

Mitochondrial bound hexokinase (HK) activity was determined based on a previous method with minor modifications (da-Silva, Gomez-Puyou et al. 2004). Briefly, enzyme's activity was determined by NADH formation in a medium containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 mM Ap5A AK inhibitor, 5 mM D-glucose, 1 mM ATP,

10 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 unit/ml Glc-6-P dehydrogenase (*Leuconostoc mesenteroides*). The reaction was started by addition of 1 mM NAD<sup>+</sup> after pre-incubation for 10 minutes at 37 °C, and the absorbance at 340 nm was monitored for 2 minutes.

#### 2.6.4. Adenylate kinase

Adenylate kinase (AK) activity was measured by a coupled enzyme assay with HK and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), according to Dzeja et al. (Dzeja, Kalvenas et al. 1985). The reaction mixture contained 100 mM KCl, 20 mM HEPES, 20 mM glucose, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM NADP<sup>+</sup>, 1 mM EDTA, 4.5 U/ml of HK, 2 U/ml of G6PD, and 1 µg of protein homogenate. The addition of 2 mM ADP started the reaction, and the reduction of NADP<sup>+</sup> was followed at 340 nm for 3 minutes in a spectrophotometer. ADP, NADP<sup>+</sup>, G6PD, and HK were dissolved in water. The results were expressed in µmol of ATP formed per min per mg of protein.

#### 2.6.5. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) activity was measured as described by Mazzola and Sirover (Mazzola and Sirover 2005) with minor modifications. Reaction mixtures contained 0.25 mM NAD<sup>+</sup> and buffer medium, pH 8.9, (100 mM glycine, 100 mM potassium phosphate monobasic and 5 mM EDTA). Samples were mixed and the reaction started by 2.2 mM glyceraldehyde-3-phosphate. The activity of GAPDH was determined by NADH formation following absorbance at 340 nm for 2 minutes and were expressed as µmol of NADH formed per min per mg of protein.

#### 2.7. Protein Determination

The protein content was determined as described by Lowry (Lowry, Rosebrough et al. 1951) in each centrifugation fraction of the cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum, using serum bovine albumin as standard.

#### 2.8. Statistical Analysis

Data were expressed as mean ± SD and analyzed by one-way ANOVA for comparison of means (Supplemental Tables 1 and 3), followed by Tukey test (Supplemental Tables 2, 4, and 5). Interactions between the treatments were verified using two-way ANOVA (PKU and Cr+Pyr as factors). Comparisons between sulfhydryl

1 content and the activities of the enzymes of the phosphotransfer network were  
2 performed through Spearman's correlation method. Data were analyzed in the Statistical  
3 Package for the Social Sciences software (SPSS 20.0 for Windows), and graphics were  
4 produced in GraphPad Prism (version 7.0 for Windows). *p* values lower than 0.05 were  
5 considered significant.  
6  
7  
8  
9

### 10 **3. RESULTS**

11 We assessed the effect of the treatments on the generation of ROS through the  
12 DCFH oxidation. Phe+ $\alpha$ MePhe administration (PKU group) increased the formation  
13 of ROS in the cerebral cortex and hippocampus, but not in the cerebellum (Fig. 1A).  
14 The DCF levels found in PKU pups treated with Cr+Pyr (PKU+Cr+Pyr group) shows  
15 that Cr+Pyr restrained ROS formation in the cerebral cortex [F(1,20) = 7,16; *p* = 0,015]  
16 and hippocampus [F(1,20) = 8,96; *p* = 0,007], keeping DCF levels comparable to those  
17 from pups which received only vehicle (Sal group). Although DCF formation was  
18 significantly higher in the cerebellum of PKU+Cr+Pyr pups than in Sal pups, such  
19 effect was not due to the synergy between the two treatments [F(1,20) = 2,07; *p* =  
20 0,166].  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

32 The induction of PKU compromised the reduced power and protein integrity,  
33 significantly decreasing SH content in the cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum  
34 (Fig. 1B). The coadministration of Cr+Pyr prevented the degradation of SH groups in  
35 the three cerebral structures under study [cortex F(1,20) = 5,57; *p* = 0,027; hippocampus  
36 F(1,20) = 8,21; *p* = 0,010; cerebellum F(1,20) = 5,46; *p* = 0,03]. PKU did not alter the  
37 GSH content in the cerebral cortex, hippocampus nor cerebellum (Fig. 1C), neither did  
38 the treatment with Cr+Pyr [cerebral cortex F(1,20) = 1,04; *p* = 0,319; hippocampus  
39 F(1,20) = 0,10; *p* = 0,753; cerebellum F(1,20) = 0,9; *p* = 0,765].  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

47 CAT, SOD and GPx provide the first line of antioxidant defense against ROS  
48 through enzyme-catalyzed dismutation of O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which is further reduced to  
49 oxygen and water (Salminen and Paul 2014). In our study, pups subjected to PKU  
50 presented decreased CAT activity in cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum  
51 (Fig. 1D), an effect prevented by cotreatment with Cr+Pyr [cerebral cortex F(1,20) =  
52 11,68; *p* = 0,003; hippocampus F(1,20) = 16,35; *p* = 0,001; cerebellum F(1,20) =  
53 11,83; *p* = 0,003]. Phe+ $\alpha$ MePhe treatment affected SOD activity only in the  
54 hippocampus, decreasing it, which Cr+Pyr coadministration avoided [F(1,20) =  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

23,29;  $p < 0,001$ ]. The treatments did not affect SOD activity neither in cerebral cortex [F(1,20) = 0,94;  $p = 0,344$ ] nor cerebellum [F(1,20) = 0,12  $p = 0,738$ ] (Fig. 1E). Phe+ $\alpha$ MePhe decreased GPx activity (Fig. 1F) in the cerebral cortex, and Cr+Pyr administration prevented it [F(1,20) = 7,88;  $p < 0,011$ ]. We verified no alteration in GPx activity in hippocampus, nor effect of Cr+Pyr on PKU condition [F(1,20) = 0,13;  $p = 0,723$ ]. PKU induction slightly enhanced GPx activity in the cerebellum, not above Sal levels, while in the PKU+Cr+Pyr group GPx activity was significantly enhanced, which would possibly be a consequence of Cr+Pyr supplementation, but we found no interaction between treatments [F(1,20) = 3,12;  $p = 0,093$ ].

Oxidative stress may compromise the phosphotransfer network efficiency, since these enzymes contain thiol groups susceptible to ROS that can trigger conformational modifications, leading to enzyme inhibition or loss of function. Pups subjected to PKU presented lower MtCK, PK and HK activities in the three cerebral structures under study (Fig. 2A, B, and C). The cotreatment with Cr+Pyr prevented such effect on MtCK activity in cerebral cortex [F(1,20) = 5,81;  $p = 0,5026$ ], hippocampus [F(1,20) = 6,00;  $p = 0,024$ ], and cerebellum [F(1,20) = 4,75;  $p = 0,041$ ], and on HK activity in cerebral cortex [F(1,20) = 5,72;  $p = 0,027$ ], hippocampus [F(1,20) = 9,88;  $p = 0,005$ ], and cerebellum [F(1,20) = 8,79  $p = 0,008$ ]. Cr+Pyr also preserved PK activity in cerebral cortex [F(1,20) = 4,55;  $p = 0,045$ ] and hippocampus [F(1,20) = 15,96;  $p = 0,001$ ], but not in cerebellum [F(1,20) = 3,97;  $p = 0,06$ ].

CytCK, AK, and GAPDH activities responded distinctly to treatments in each cerebral structure. Phe+ $\alpha$ MePhe administration impaired CytCk activity in the cerebral cortex, and Cr+Pyr prevented it [F(1,20) = 12,38;  $p = 0,002$ ], but promoted no alteration on this enzyme activity in the hippocampus [F(1,20) = 0,87;  $p = 0,361$ ] nor cerebellum [F(1,20) = 2,03;  $p = 0,170$ ] (Fig. 2D). Phe+ $\alpha$ MePhe did not affect AK activity in cerebral cortex [F(1,20) = 0,95;  $p = 0,340$ ], but decreased it in hippocampus, which Cr+Pyr prevented [F(1,20) = 6,21;  $p = 0,022$ ], and enhanced AK activity in the cerebellum, an effect that was mitigated by Cr+Pyr as seen in the PKU+Cr+Pyr group [F(1,20) = 14,18;  $p = 0,001$ ] (Fig. 2E). PKU induction diminished GAPDH activity in cerebral cortex, and enhanced it in the cerebellum, both effects prevented by Cr+Pyr cotreatment [cerebral cortex F(1,20) = 5,89;  $p = 0,025$ ; cerebellum F(1,20) = 12,26;  $p = 0,002$ ]. Phe+ $\alpha$ MePhe administration did not alter GAPDH activity in the

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

hippocampus, while Cr+Pyr treatment increased it, and, although insignificant, this effect remained noticeable in PKU+Cr+Pyr group [F(1,20) = 0,06;  $p = 0,807$ ] (Fig. 2F).

The brains from pups subjected to PKU were remarkably smaller, and indeed weighted about 20% less than the whole brain from animals treated with vehicle (Table 1). This effect was partially prevented by Cr+Pyr, as observed in the PKU+Cr+Pyr group [F(1,44) = 17,64  $p < 0,001$ ]. The cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum suffered the same effect under PKU induction. Although the hippocampus and cerebral cortex of pups subjected to PKU and cotreated with Cr+Pyr presented a weight similar to Sal treated pups, it is unclear if Cr+Pyr is responsible for such effect [F(1,44) = 0,30;  $p = 0,586$ ; hippocampus F(1,44) = 3,76;  $p = 0,059$ ; cerebellum F(1,44) = 1,10;  $p = 0,30$ ].

Since the integrity of thiol-groups influence the ligand and substrate binding properties, as well as the conformational changes that result in the activation of enzymes, we choose SH content to prospect whether oxidative stress would be related to the alterations in the phosphotransfer network. Further, PKU induction decreased SH content uniformly in the cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum, suggesting protein damage, and Cr+Pyr prevented it in the three cerebral structures. We found significant Spearman's correlations (Table 2), indicating dependence between alteration in the activity of enzymes in the phosphotransfer network and damage to sulfhydryl groups, possibly due to oxidative stress.

#### 4. DISCUSSION

Oxidative stress and energy metabolism are intimately related. OXPHOS is the main source of ROS, generated as by-products in the electron transport chain. Indeed, 1-2% of the O<sub>2</sub> consumed by the respiratory chain is diverted to generate ROS such as superoxide (O<sup>•</sup><sub>2</sub>) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), mainly through the respiratory complexes I and III (Cadenas and Davies 2000). Agreeing, we have previously reported that PKU impairs the activity of these complexes in the cerebral cortex of Wistar rats (Rech, Feksa et al. 2002). In the present study, PKU induction increased ROS formation in the cerebral cortex and hippocampus. The cotreatment with Cr+Pyr prevented ROS increase in these cerebral structures, but in the cerebellum, it slightly enhanced the ROS production elicited by PKU. It is possible that the enhancement in the GPx activity observed in cerebellum accounted for ROS detoxification, along with unaltered SOD

1 activity. Also, brain structures and regions present idiosyncratic susceptibility to ROS  
2 and antioxidant defenses, so it is reasonable that distinct structures present diverging  
3 responses to oxidative stress (Calabrese, Scapagnini et al. 2002, Campese, Sindhu et al.  
4 2007).

5  
6  
7 The brain is highly susceptible to redox imbalance, partly because of its high  
8 uptake of oxygen, accounting for up to 20% of basal O<sub>2</sub> consumption, partly a  
9 consequence of its modest antioxidant defenses – the levels of antioxidant enzymes  
10 such as GPx and CAT are low in most brain regions (Halliwell 1992, Cobley, Fiorello et  
11 al. 2018), while brain metabolism generates considerable amounts of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Gal, Zheng  
12 et al. 2005). Veyrat-Durebex and colleagues described that HPA correlates with a global  
13 decrease in the expression of 22 antioxidant genes in white blood cells of PKU patients  
14 (Veyrat-Durebex, Debeissat et al. 2017), and Zhang and Gu reported altered gene  
15 expression in embryonic rat neurons induced by Phe, notably mRNA up-regulation of  
16 manganese-containing SOD and copper-zinc containing SOD (Zhang and Gu 2005).  
17 Our PKU model disturbed the activity of CAT, SOD, and GPx, enzymes involved in  
18 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification. Pups subjected to PKU presented lower CAT activities in the  
19 cerebral cortex (-41%), hippocampus (-34-36%) and cerebellum (-37-42%). SOD was  
20 altered only in the hippocampus, as evidenced by the activity 20-26% lower than Sal in  
21 the PKU group. GPx activity was 31-35% inferior to Sal in the PKU group in the  
22 cerebral cortex, and 26-38% higher than Sal in the PKU+Cr+Pyr group in the  
23 cerebellum. The cotreatment with Cr+Pyr prevented most of the alterations induced by  
24 PKU on the antioxidant enzymes possibly acting as scavengers (Lawler, Barnes et al.  
25 2002, Long and Halliwell 2009, Kladna, Marchlewicz et al. 2015), which agrees with  
26 the prevention against ROS formation in cerebral cortex and hippocampus, and the  
27 protection of SH groups observed in the three brain structures.

28  
29  
30 The communication between intracellular compartments of ATP consumption  
31 and production performed by phosphotransfer enzymes also plays an antioxidant role.  
32 The ADP generated by HK activity reaches the mitochondrial matrix promptly, where it  
33 is used as a substrate by F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase to produce ATP at the expenses of  
34 mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) (da-Silva, Gomez-Puyou et al. 2004). This  
35 ATP is further exchanged with another external ADP molecule to be utilized again by  
36 HK, generating cycling of ADP/ATP that keeps the ADP at steady-state levels and low  
37  $\Delta\Psi_m$  values (Korshunov, Skulachev et al. 1997, Zorova, Popkov et al.  
38 2018). CytCK and MtCK prevent ROS accumulation in a similar way, coupling



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

OXPPOS and the phosphorylation of Cr into phosphocreatine (PCr) using intramitochondrially produced ATP. PCr is exported to the cytosol, whereas the produced ADP is pumped back to the mitochondrial matrix via adenine nucleotide translocator (ANT), thus stimulating OXPPOS (Meyer, Machado et al. 2006). AK present in mitochondrial compartments also supports the ADP/ATP cycling, enabling the transfer and making available the energy of two high-energy phosphoryls, the  $\beta$ - and the  $\gamma$ -phosphoryls of a single ATP molecule. The resulting AMP signals feedback to mitochondrial respiration amplified by the generation of two molecules of ADP at the mitochondrial intermembrane site (Dzeja and Terzic 2009).

Oxidative inactivation of glycolytic enzymes is observed in organisms ranging from *E. coli* to mammalian cells (Reichmann, Voth et al. 2018). PK, which catalyzes the irreversible conversion of phosphoenolpyruvate to pyruvate, can be inactivated by  $H_2O_2$  (Halliwell and Gutteridge 2007). Moreover, in vitro (Feksa, Cornelio et al. 2003, Horster, Schwab et al. 2006, Yuan, McNae et al. 2018) and in vivo (Weber 1969, Miller, Hawkins et al. 1973, Feksa, Cornelio et al. 2002, Bortoluzzi, de Franceschi et al. 2014) studies describe the inhibitory effect of Phe over PK activity, and so we observed in the present study. Oxidative and allosteric inhibition of brain PK activity may be related to the reduction of glucose metabolism observed in the brain of the phenylketonuric patients (Pietz, Rupp et al. 2003, Wasserstein, Snyderman et al. 2006, Ficiocioglu, Dubroff et al. 2013). GAPDH also suffers oxidative inactivation, being able to sense redox changes through a cysteine residue in the catalytic domain. This cysteine is particularly sensitive to  $H_2O_2$ -induced oxidation, which leads to the formation of a cysteine sulfenic acid, a reaction that inactivates GAPDH, and acts as a metabolic switch for rerouting the carbohydrate flux from glycolysis to pentose phosphate pathway, aiming to reestablish the redox equilibrium of the cytoplasmic NADP(H) (Hildebrandt, Knesting et al. 2015). More studies are required to clarify the consequences of oxidative stress over energy pathways of the brain in PKU.

The effects of Cr+Pyr we observed in oxidative stress parameters and phosphotransfer network may rely on Cr and Pyr properties to act both as antioxidants and energy substrates. Studies report that cotreatment with Cr ameliorates conditions like Alzheimer disease, and other age-related neurodegenerative diseases presenting energy failure and oxidative stress among their pathophysiological mechanisms (Smith, Agharkar et al. 2014, Rae and Broer 2015). Pyr can increase neuronal survival after events such as excitotoxic cascades triggered by ischemic injury suppressing ROS

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

generation and preventing ATP depletion (Suh, Aoyama et al. 2005, Yu, Kim et al. 2005, Moro, Ghavim et al. 2016). The phosphotransfer network is remarkably plastic – remodeling the cellular energy network compensates deficiency in a specific enzyme – but the disturbance in the activity of two or more enzymes can lead to energy inefficiency (Dzeja, Hoyer et al. 2011). Because of poor antioxidant defenses in the brain, it is conceivable that the mechanisms recycling ADP play a role in counteracting oxidative stress. Cr and Pyr have antioxidant and energy properties, being able to scavenge ROS and to favor the ADP/ATP ratio for normal mitochondrial function.

It is well-described that PKU affects brain mass and volume (Pearsen, Gean-Marton et al. 1990, Pfaendner, Reuner et al. 2005, Perez-Duenas, Pujol et al. 2006, Bodner, Aldridge et al. 2012), and our model reproduced it. The rat brain increases more than 6× in mass from birth to adulthood. Cerebral cortex and hippocampus follow this pattern, but cerebellum goes through a much superior relative gain in mass, by a factor of 20.7, which agrees with its predominantly postnatal development (Altman 1969, Bandeira, Lent et al. 2009). These particularities of postnatal cerebral development may be relevant to understand and further investigate the response of each cerebral structure to PKU induction and Cr+Pyr supplementation.

In conclusion, we observed oxidative stress and energy metabolism alterations occurring concomitantly, also that there is a correlation between damage to sulfhydryl groups and disturbance of energy homeostasis in the cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum of young Wistar rats subjected to PKU. Further, we demonstrated that the supplementation with a combination of energetic and antioxidant substrates, creatine and pyruvate, was able to prevent most of the alterations on both sets of parameters evaluated. **Future research might elucidate the linkage between oxidative stress and disturbances of the phosphotransfer network, clarifying how these processes contribute to the pathophysiology underlying cerebral underdevelopment in PKU. Although more experiments should be carried out, the results open a new possible approach for nutritional management of PKU. We suggest that creatine and pyruvate supplementation, in addition to Phe restrictive diets, may offer clinical benefits for PKU children by preventing redox imbalance and energy inefficiency throughout brain development and maturation in early ages.**

**Funding:** This study was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico (CNPq) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) Rede Instituto Brasileiro de Neurociência.

**Conflict of interest:** We have no conflict of interest to declare.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## REFERENCES

1  
2  
3  
4  
5 Aebi, H. (1984). "Catalase in vitro." Methods Enzymol **105**: 121-126.

6  
7  
8 Aksenov, M. Y. and W. R. Markesbery (2001). "Changes in thiol content and expression of  
9 glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease."  
10 Neurosci Lett **302**(2-3): 141-145.

11  
12  
13  
14 Altman, J. (1969). "Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 3.  
15 Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats." J  
16 Comp Neurol **136**(3): 269-293.

17  
18  
19 Anderson, P. J. and V. Leuzzi (2010). "White matter pathology in phenylketonuria." Mol Genet  
20 Metab **99 Suppl 1**: S3-9.

21  
22  
23  
24 Bandeira, F., R. Lent and S. Herculano-Houzel (2009). "Changing numbers of neuronal and  
25 non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat." Proc Natl Acad Sci U S A  
26 **106**(33): 14108-14113.

27  
28  
29  
30 Berti, S. L., G. M. Nasi, C. Garcia, F. L. Castro, M. L. Nunes, D. B. Rojas, T. B. Moraes, C. S.  
31 Dutra-Filho and C. M. Wannmacher (2012). "Pyruvate and creatine prevent oxidative stress and  
32 behavioral alterations caused by phenylalanine administration into hippocampus of rats." Metab  
33 Brain Dis **27**(1): 79-89.

34  
35  
36  
37  
38 Bilder, D. A., B. K. Burton, H. Coon, L. Leviton, J. Ashworth, B. D. Lundy, H. Vespa, A. V.  
39 Bakian and N. Longo (2013). "Psychiatric symptoms in adults with phenylketonuria." Mol  
40 Genet Metab **108**(3): 155-160.

41  
42  
43  
44 Bilder, D. A., J. K. Noel, E. R. Baker, W. Irish, Y. Chen, M. J. Merilainen, S. Prasad and B. J.  
45 Winslow (2016). "Systematic Review and Meta-Analysis of Neuropsychiatric Symptoms and  
46 Executive Functioning in Adults With Phenylketonuria." Dev Neuropsychol **41**(4): 245-260.

47  
48  
49  
50 Blau, N. (2016). "Genetics of Phenylketonuria: Then and Now." Hum Mutat **37**(6): 508-515.

51  
52  
53 Bodner, K. E., K. Aldridge, A. J. Moffitt, D. Peck, D. A. White and S. E. Christ (2012). "A  
54 volumetric study of basal ganglia structures in individuals with early-treated phenylketonuria."  
55 Mol Genet Metab **107**(3): 302-307.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Bortoluzzi, V. T., I. D. de Franceschi, E. Rieger and C. M. Wannmacher (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." Neurochem Res **39**(8): 1594-1602.

Browne, R. W. and D. Armstrong (1998). "Reduced glutathione and glutathione disulfide." Methods Mol Biol **108**: 347-352.

Cadenas, E. and K. J. Davies (2000). "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging." Free Radic Biol Med **29**(3-4): 222-230.

Calabrese, V., G. Scapagnini, A. Ravagna, R. G. Fariello, A. M. Giuffrida Stella and N. G. Abraham (2002). "Regional distribution of heme oxygenase, HSP70, and glutathione in brain: relevance for endogenous oxidant/antioxidant balance and stress tolerance." J Neurosci Res **68**(1): 65-75.

Campese, V. M., R. K. Sindhu, S. Ye, Y. Bai, N. D. Vaziri and B. Jabbari (2007). "Regional expression of NO synthase, NAD(P)H oxidase and superoxide dismutase in the rat brain." Brain Res **1134**(1): 27-32.

Cobley, J. N., M. L. Fiorello and D. M. Bailey (2018). "13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress." Redox Biology **15**: 490-503.

Costabeber, E., A. Kessler, C. Severo Dutra-Filho, A. T. de Souza Wyse, M. Wajner and C. M. Wannmacher (2003). "Hyperphenylalaninemia reduces creatine kinase activity in the cerebral cortex of rats." Int J Dev Neurosci **21**(2): 111-116.

da-Silva, W. S., A. Gomez-Puyou, M. T. de Gomez-Puyou, R. Moreno-Sanchez, F. G. De Felice, L. de Meis, M. F. Oliveira and A. Galina (2004). "Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense: steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria." J Biol Chem **279**(38): 39846-39855.

de Groot, M. J., M. Hoeksma, D. J. Reijngoud, H. W. de Valk, A. M. Paans, P. J. Sauer and F. J. van Spronsen (2013). "Phenylketonuria: reduced tyrosine brain influx relates to reduced cerebral protein synthesis." Orphanet J Rare Dis **8**: 133.

Dimer, N. W., B. K. Ferreira, J. F. Agostini, M. L. Gomes, L. W. Kist, F. Malgarin, M. Carvalho-Silva, L. M. Gomes, J. Rebelo, M. J. S. Frederico, F. Silva, E. P. Rico, M. R. Bogo, E.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

L. Streck, G. C. Ferreira and P. F. Schuck (2018). "Brain bioenergetics in rats with acute hyperphenylalaninemia." Neurochem Int **117**: 188-203.

Dos Reis, E. A., E. Rieger, S. S. de Souza, A. A. Rasia-Filho and C. M. Wannmacher (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." Metab Brain Dis **28**(3): 509-517.

Dzeja, P., A. Kalvenas, A. Toleikis and A. Praskevicius (1985). "The effect of adenylate kinase activity on the rate and efficiency of energy transport from mitochondria to hexokinase." Biochem Int **10**(2): 259-265.

Dzeja, P. and A. Terzic (2009). "Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing." Int J Mol Sci **10**(4): 1729-1772.

Dzeja, P. P., K. Hoyer, R. Tian, S. Zhang, E. Nemetlu, M. Spindler and J. S. Ingwall (2011). "Rearrangement of energetic and substrate utilization networks compensate for chronic myocardial creatine kinase deficiency." J Physiol **589**(Pt 21): 5193-5211.

Dzeja, P. P. and A. Terzic (2003). "Phosphotransfer networks and cellular energetics." J Exp Biol **206**(Pt 12): 2039-2047.

Feksa, L. R., A. R. Cornelio, C. S. Dutra-Filho, A. T. de Souza Wyse, M. Wajner and C. M. Wannmacher (2003). "Characterization of the inhibition of pyruvate kinase caused by phenylalanine and phenylpyruvate in rat brain cortex." Brain Res **968**(2): 199-205.

Feksa, L. R., A. R. Cornelio, V. C. Rech, C. S. Dutra-Filho, A. T. Wyse, M. Wajner and C. M. Wannmacher (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.

Ficicioglu, C., J. G. Dubroff, N. Thomas, P. R. Gallagher, J. Burfield, C. Hussa, R. Randall and H. Zhuang (2013). "A Pilot Study of Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography Findings in Patients with Phenylketonuria before and during Sapropterin Supplementation." J Clin Neurol **9**(3): 151-156.

Gal, S., H. Zheng, M. Fridkin and M. B. Youdim (2005). "Novel multifunctional neuroprotective iron chelator-monoamine oxidase inhibitor drugs for neurodegenerative diseases. In vivo selective brain monoamine oxidase inhibition and prevention of MPTP-induced striatal dopamine depletion." J Neurochem **95**(1): 79-88.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Gonzalez, M. J., A. P. Gutierrez, R. Gassio, M. E. Fuste, M. A. Vilaseca and J. Campistol (2011). "Neurological complications and behavioral problems in patients with phenylketonuria in a follow-up unit." Mol Genet Metab **104 Suppl**: S73-79.

Halliwell, B. (1992). "Reactive oxygen species and the central nervous system." J Neurochem **59**(5): 1609-1623.

Hildebrandt, T., J. Knuesting, C. Berndt, B. Morgan and R. Scheibe (2015). "Cytosolic thiol switches regulating basic cellular functions: GAPDH as an information hub?" Biol Chem **396**(5): 523-537.

Horster, F., M. A. Schwab, S. W. Sauer, J. Pietz, G. F. Hoffmann, J. G. Okun, S. Kolker and S. Kins (2006). "Phenylalanine reduces synaptic density in mixed cortical cultures from mice." Pediatr Res **59**(4 Pt 1): 544-548.

Hughes, B. P. (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.

Kayaalp, E., E. Treacy, P. J. Waters, S. Byck, P. Nowacki and C. R. Scriver (1997). "Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations." The American Journal of Human Genetics **61**(6): 1309-1317.

Kienzle Hagen, M. E., C. D. Pederzoli, A. M. Sgaravatti, R. Bridi, M. Wajner, C. M. Wannmacher, A. T. Wyse and C. S. Dutra-Filho (2002). "Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain." Biochim Biophys Acta **1586**(3): 344-352.

Kladna, A., M. Marchlewicz, T. Piechowska, I. Kruk and H. Y. Aboul-Enein (2015). "Reactivity of pyruvic acid and its derivatives towards reactive oxygen species." Luminescence **30**(7): 1153-1158.

Korshunov, S. S., V. P. Skulachev and A. A. Starkov (1997). "High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria." FEBS Lett **416**(1): 15-18.

Lawler, J. M., W. S. Barnes, G. Wu, W. Song and S. Demaree (2002). "Direct antioxidant properties of creatine." Biochem Biophys Res Commun **290**(1): 47-52.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

LeBel, C. P., H. Ischiropoulos and S. C. Bondy (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.

Leong, S. F., J. C. Lai, L. Lim and J. B. Clark (1981). "Energy-metabolizing enzymes in brain regions of adult and aging rats." J Neurochem **37**(6): 1548-1556.

Long, L. H. and B. Halliwell (2009). "Artefacts in cell culture: pyruvate as a scavenger of hydrogen peroxide generated by ascorbate or epigallocatechin gallate in cell culture media." Biochem Biophys Res Commun **388**(4): 700-704.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.

MacDonald, A., H. Gokmen-Ozel, M. van Rijn and P. Burgard (2010). "The reality of dietary compliance in the management of phenylketonuria." J Inherit Metab Dis **33**(6): 665-670.

Marklund, S. and G. Marklund (1974). "Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase." Eur J Biochem **47**(3): 469-474.

Martynyuk, A. E., A. V. Glushakov, C. Summers, P. J. Laipis, D. M. Dennis and C. N. Seubert (2005). "Impaired glutamatergic synaptic transmission in the PKU brain." Mol Genet Metab **86 Suppl 1**: S34-42.

Mazzola, J. L. and M. A. Sirover (2005). "Aging of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is dependent on its subcellular localization." Biochim Biophys Acta **1722**(2): 168-174.

Meyer, L. E., L. B. Machado, A. P. Santiago, W. S. da-Silva, F. G. De Felice, O. Holub, M. F. Oliveira and A. Galina (2006). "Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation: antioxidant role of mitochondrial kinase-dependent ADP re-cycling activity." J Biol Chem **281**(49): 37361-37371.

Miller, A. L., R. A. Hawkins and R. L. Veech (1973). "Phenylketonuria: phenylalanine inhibits brain pyruvate kinase in vivo." Science **179**(4076): 904-906.

Moraes, T. B., C. E. Jacques, A. P. Rosa, G. R. Dalazen, M. Terra, J. G. Coelho and C. S. Dutra-Filho (2013). "Role of catalase and superoxide dismutase activities on oxidative stress in



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

the brain of a phenylketonuria animal model and the effect of lipoic acid." Cell Mol Neurobiol **33**(2): 253-260.

Moro, N., S. S. Ghavim, N. G. Harris, D. A. Hovda and R. L. Sutton (2016). "Pyruvate treatment attenuates cerebral metabolic depression and neuronal loss after experimental traumatic brain injury." Brain Res **1642**: 270-277.

Pearson, K. D., A. D. Gean-Marton, H. L. Levy and K. R. Davis (1990). "Phenylketonuria: MR imaging of the brain with clinical correlation." Radiology **177**(2): 437-440.

Perez-Duenas, B., J. Pujol, C. Soriano-Mas, H. Ortiz, R. Artuch, M. A. Vilaseca and J. Campistol (2006). "Global and regional volume changes in the brains of patients with phenylketonuria." Neurology **66**(7): 1074-1078.

Pfaendner, N. H., G. Reuner, J. Pietz, G. Jost, D. Rating, V. A. Magnotta, A. Mohr, B. Kress, K. Sartor and S. Hahnel (2005). "MR imaging-based volumetry in patients with early-treated phenylketonuria." AJNR Am J Neuroradiol **26**(7): 1681-1685.

Pietz, J., A. Rupp, F. Ebinger, D. Rating, E. Mayatepek, C. Boesch and R. Kreis (2003). "Cerebral energy metabolism in phenylketonuria: findings by quantitative In vivo 31P MR spectroscopy." Pediatr Res **53**(4): 654-662.

Preissler, T., I. J. Bristot, B. M. Costa, E. K. Fernandes, E. Rieger, V. T. Bortoluzzi, I. D. de Franceschi, C. S. Dutra-Filho, J. C. Moreira and C. M. Wannmacher (2016). "Phenylalanine induces oxidative stress and decreases the viability of rat astrocytes: possible relevance for the pathophysiology of neurodegeneration in phenylketonuria." Metab Brain Dis **31**(3): 529-537.

Rae, C. D. and S. Broer (2015). "Creatine as a booster for human brain function. How might it work?" Neurochem Int **89**: 249-259.

Rausell, D., A. García-Blanco, P. Correcher, I. Vitoria, M. Vento and C. Cháfer-Pericás (2019). "Newly validated biomarkers of brain damage may shed light into the role of oxidative stress in the pathophysiology of neurocognitive impairment in dietary restricted phenylketonuria patients." Pediatric Research **85**(2): 242-250.

Rech, V. C., L. R. Feksa, C. S. Dutra-Filho, A. T. Wyse, M. Wajner and C. M. Wannmacher (2002). "Inhibition of the mitochondrial respiratory chain by phenylalanine in rat cerebral cortex." Neurochem Res **27**(5): 353-357.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Reichmann, D., W. Voth and U. Jakob (2018). "Maintaining a Healthy Proteome during Oxidative Stress." *Mol Cell* **69**(2): 203-213.

Ribas, G. S., A. Sitta, M. Wajner and C. R. Vargas (2011). "Oxidative stress in phenylketonuria: what is the evidence?" *Cell Mol Neurobiol* **31**(5): 653-662.

Ryu, J. K., H. B. Choi and J. G. McLarnon (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**(4): 1835-1848.

Salminen, L. E. and R. H. Paul (2014). "Oxidative stress and genetic markers of suboptimal antioxidant defense in the aging brain: a theoretical review." *Rev Neurosci* **25**(6): 805-819.

Sanayama, Y., H. Nagasaka, M. Takayanagi, T. Ohura, O. Sakamoto, T. Ito, M. Ishige-Wada, H. Usui, M. Yoshino, A. Ohtake, T. Yorifuji, H. Tsukahara, S. Hirayama, T. Miida, M. Fukui and Y. Okano (2011). "Experimental evidence that phenylalanine is strongly associated to oxidative stress in adolescents and adults with phenylketonuria." *Mol Genet Metab* **103**(3): 220-225.

Schlattner, U., A. Klaus, S. Ramirez Rios, R. Guzun, L. Kay and M. Tokarska-Schlattner (2016). "Cellular compartmentation of energy metabolism: creatine kinase microcompartments and recruitment of B-type creatine kinase to specific subcellular sites." *Amino Acids* **48**(8): 1751-1774.

Schuck, P. F., F. Malgarin, J. H. Cararo, F. Cardoso, E. L. Streck and G. C. Ferreira (2015). "Phenylketonuria Pathophysiology: on the Role of Metabolic Alterations." *Aging Dis* **6**(5): 390-399.

Scriver, C. R. (1995). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York, McGraw-Hill, Health Professions Division.

Sirtori, L. R., C. S. Dutra-Filho, D. Fitarelli, A. Sitta, A. Haeser, A. G. Barschak, M. Wajner, D. M. Coelho, S. Llesuy, A. Bello-Klein, R. Giugliani, M. Deon and C. R. Vargas (2005). "Oxidative stress in patients with phenylketonuria." *Biochim Biophys Acta* **1740**(1): 68-73.

Smith, R. N., A. S. Agharkar and E. B. Gonzales (2014). "A review of creatine supplementation in age-related diseases: more than a supplement for athletes." *F1000Res* **3**: 222.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Stepien, K. M., R. Heaton, S. Rankin, A. Murphy, J. Bentley, D. Sexton and I. P. Hargreaves (2017). "Evidence of Oxidative Stress and Secondary Mitochondrial Dysfunction in Metabolic and Non-Metabolic Disorders." J Clin Med **6**(7).

Stockler, S., U. Holzbach, F. Hanefeld, I. Marquardt, G. Helms, M. Requart, W. Hanicke and J. Frahm (1994). "Creatine deficiency in the brain: a new, treatable inborn error of metabolism." Pediatr Res **36**(3): 409-413.

Suh, S. W., K. Aoyama, Y. Matsumori, J. Liu and R. A. Swanson (2005). "Pyruvate administered after severe hypoglycemia reduces neuronal death and cognitive impairment." Diabetes **54**(5): 1452-1458.

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

van Wegberg, A. M. J., A. MacDonald, K. Ahring, A. Belanger-Quintana, N. Blau, A. M. Bosch, A. Burlina, J. Campistol, F. Feillet, M. Gizewska, S. C. Huijbregts, S. Kearney, V. Leuzzi, F. Maillot, A. C. Muntau, M. van Rijn, F. Trefz, J. H. Walter and F. J. van Spronsen (2017). "The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment." Orphanet J Rare Dis **12**(1): 162.

Veyrat-Durebex, C., C. Debeissat, H. Blasco, F. Patin, H. Henique, P. Emond, C. Antar, V. Gissot, O. Herault and F. Maillot (2017). "Hyperphenylalaninemia Correlated with Global Decrease of Antioxidant Genes Expression in White Blood Cells of Adult Patients with Phenylketonuria." JIMD Rep **37**: 73-83.

Wasserstein, M. P., S. E. Snyderman, C. Sansaricq and M. S. Buchsbaum (2006). "Cerebral glucose metabolism in adults with early treated classic phenylketonuria." Mol Genet Metab **87**(3): 272-277.

Weber, G. (1969). "Inhibition of human brain pyruvate kinase and hexokinase by phenylalanine and phenylpyruvate: possible relevance to phenylketonuric brain damage." Proc Natl Acad Sci U S A **63**(4): 1365-1369.

Wendel, A. (1981). "Glutathione peroxidase." Methods Enzymol **77**: 325-333.

Yu, Y. M., J. B. Kim, K. W. Lee, S. Y. Kim, P. L. Han and J. K. Lee (2005). "Inhibition of the cerebral ischemic injury by ethyl pyruvate with a wide therapeutic window." Stroke **36**(10): 2238-2243.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Yuan, M., I. W. McNae, Y. Chen, E. A. Blackburn, M. A. Wear, P. A. M. Michels, L. A. Fothergill-Gilmore, T. Hupp and M. D. Walkinshaw (2018). "An allostatic mechanism for M2 pyruvate kinase as an amino-acid sensor." Biochemical Journal **475**(10): 1821.

Zhang, H. and X. F. Gu (2005). "A study of gene expression profiles of cultured embryonic rat neurons induced by phenylalanine." Metab Brain Dis **20**(1): 61-72.

Zorova, L. D., V. A. Popkov, E. Y. Plotnikov, D. N. Silachev, I. B. Pevzner, S. S. Jankauskas, V. A. Babenko, S. D. Zorov, A. V. Balakireva, M. Juhaszova, S. J. Sollott and D. B. Zorov (2018). "Mitochondrial membrane potential." Anal Biochem **552**: 50-59.

## FIGURE LEGENDS

1  
2  
3  
4 **Fig. 1.** Effects of PKU induction and/or Cr+Pyr administration on parameters of  
5 oxidative stress. Data are expressed as mean  $\pm$  SD for 6 animals in each group. DCFH  
6 (2',7'-dihydrodichloro fluorescein oxidation), expressed as nmol of DCF per mg of  
7 protein; SH (sulfhydryl content), expressed as nmol TNB/mg protein; GSH (reduced  
8 glutathione), expressed as nmol of GSH per mg of protein; GPx (glutathione  
9 peroxidase), expressed as  $\mu$ mol of NADPH per min per mg of protein; SOD (superoxide  
10 dismutase), expressed as SOD U per mg of protein; CAT (catalase), expressed as CAT  
11 U per mg of protein. \* $p$ <0.005 compared to the other groups; \*\* $p$ <0.05 compared to  
12 saline and PKU; #equal to Cr+Pyr+PKU (one-way ANOVA followed by the Tukey  
13 test).  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

25 **Fig. 2.** Effects of PKU induction and/or Cr+Pyr administration on enzymes of  
26 phosphoryl transfer network. Data are expressed as mean  $\pm$  SD for 6 animals per group.  
27 MtCK (mitochondrial creatine kinase) and CytCK (cytosolic creatine kinase) are  
28 expressed as  $\mu$ mol of creatine per min per mg of protein; AK (adenylate kinase),  
29 expressed as  $\mu$ mol of ATP per min per mg of protein; PK (pyruvate kinase), expressed  
30 as  $\mu$ mol of pyruvate per min per mg of protein; HK (hexokinase), expressed as  $\mu$ mol of  
31 NADH per min per mg of protein; GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate  
32 dehydrogenase), expressed as  $\mu$ mol of NADH per min per mg of protein. \* $p$ <0.005  
33 compared to the other groups (one-way ANOVA followed by the Tukey test).  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Figure 1

[Click here to access/download;Figure;Fig. 1 Oxidative Stress.tif](#)

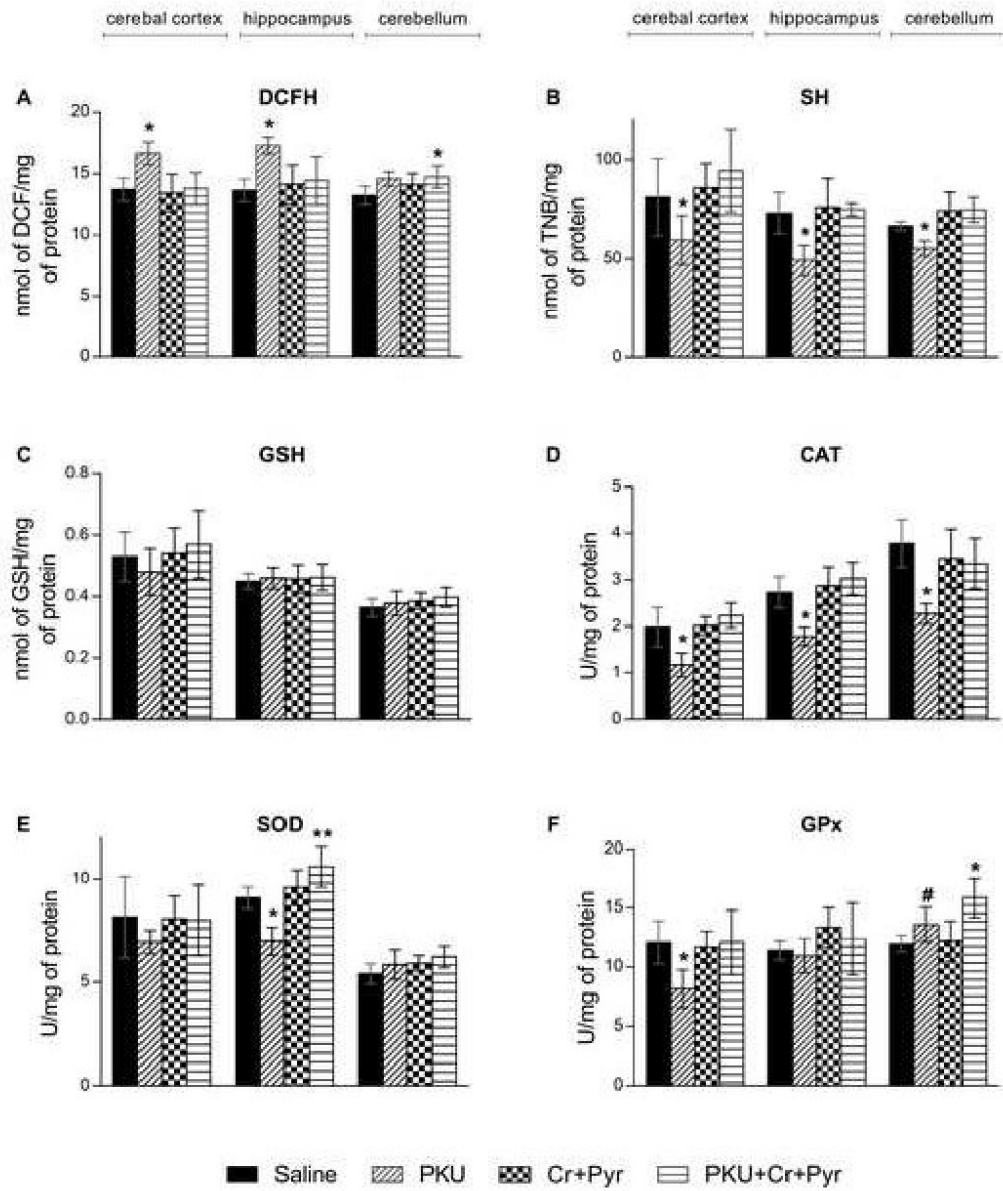


Figure 2

[Click here to access/download;Figure;Fig. 2 Phosphotransfer enzymes.tif](#)

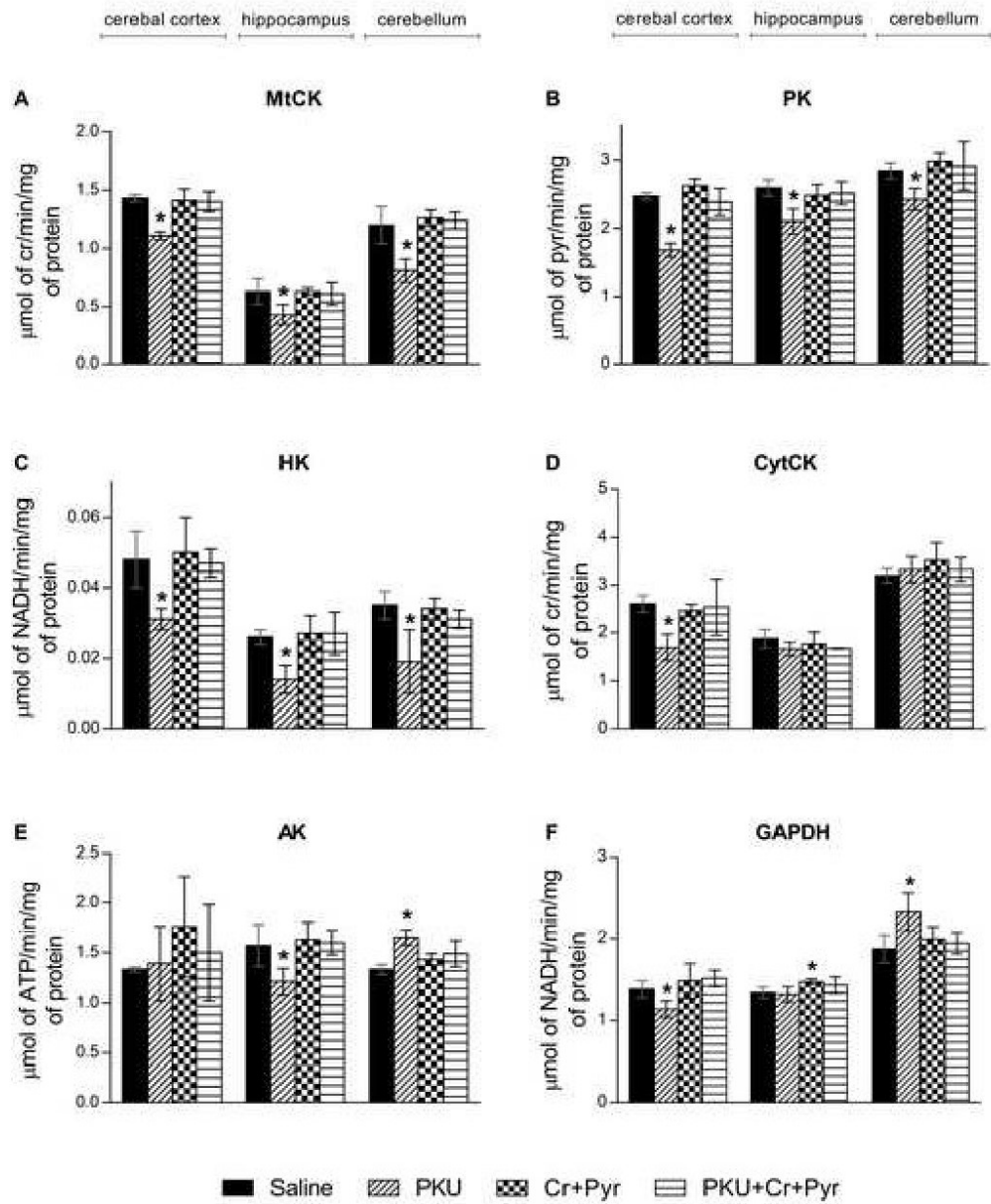


Table 1

**Table 1:** Effects of Phe+ $\alpha$ MePhe load (PKU) and/or Cr+Pyr administration on the weight of the whole brain and cerebral structures.

	Saline	PKU	Cr+Pyr	PKU+Cr+Pyr
Whole brain	1.25 $\pm$ 0.049	1.02 $\pm$ 0.05*	1.2 $\pm$ 0.065	1.11 $\pm$ 0.048 <sup>#</sup>
Cerebral cortex	0.494 $\pm$ 0.025	0.456 $\pm$ 0.023 <sup>#</sup>	0.517 $\pm$ 0.021*	0.473 $\pm$ 0.015 <sup>##</sup>
Hippocampus	0.0811 $\pm$ 0.004	0.0712 $\pm$ 0.006*	0.0821 $\pm$ 0.006	0.078 $\pm$ 0.005
Cerebellum	0.152 $\pm$ 0.011	0.117 $\pm$ 0.012*	0.146 $\pm$ 0.014	0.119 $\pm$ 0.013 <sup>#*</sup>

Data are expressed in grams as mean  $\pm$  SD for 12 animals in each group. \* $p < 0.005$  compared to the other groups; <sup>#</sup> $p < 0.005$  compared to saline; <sup>##</sup>equal to saline but not different from PKU; <sup>#\*</sup>equal to PKU,  $p < 0.005$  from saline (one-way ANOVA followed by the Tukey test).



Table 2

**Table 2:** Spearman's correlation coefficient between total sulfhydryl content and thiol-containing enzymes activities of phosphoryl transfer network in the cerebral structures.

Enzyme	Cerebral Cortex	Hippocampus	Cerebellum
MtCK	0.625**	0.394	0.526*
PK	0.753**	0.589*	0.741*
HK	0.389*	0.467*	0.307
CytCK	0.528**	0.424*	0.150
AK	0.178	0.449*	-0.389
GAPDH	0.796**	0.508*	-0.610**

\*  $\rho < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ . Abbreviations: MtCK (mitochondrial creatine kinase); PK (pyruvate kinase); HK (hexokinase); CytCK (cytosolic creatine kinase); AK (adenylate kinase); GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase).

## Supplemental Material

Supplemental Table 1. Effect of Phe+ $\alpha$ MePhe and Cr+Pyr administration on parameters of oxidative stress in A) cerebral cortex, B) hippocampus, and C) cerebellum of Wistar rats.

A

Groups	Saline	Cr+Pyr	PKU	PKU+Cr+Pyr
DCFH	13.7 $\pm$ 0.94	13.43 $\pm$ 1.52	16.67 $\pm$ 0.94*	13.78 $\pm$ 1.29
SH	78.77 $\pm$ 12.5	86.36 $\pm$ 11.24	57.81 $\pm$ 11.76*	89.72 $\pm$ 14.35
GSH	0.53 $\pm$ 0.08	0.54 $\pm$ 0.083	0.48 $\pm$ 0.076	0.57 $\pm$ 0.11
GPx	12.08 $\pm$ 1.81	11.73 $\pm$ 1.2	8.13 $\pm$ 1.42*	12.1 $\pm$ 2.7
SOD	8.15 $\pm$ 1.99	8.05 $\pm$ 1.11	6.93 $\pm$ 0.56	7.98 $\pm$ 1.71
CAT	1.98 $\pm$ 0.43	2.02 $\pm$ 0.47	1.167 $\pm$ 0.26*	2.23 $\pm$ 0.27

B

Groups	Saline	Cr+Pyr	PKU	PKU+Cr+Pyr
DCFH	13.63 $\pm$ 0.91	14.13 $\pm$ 1.58	17.32 $\pm$ 0.67*	14.43 $\pm$ 1.97
SH	73.05 $\pm$ 10.33	75.93 $\pm$ 14.45	49.15 $\pm$ 7.52*	74.88 $\pm$ 3.04
GSH	0.45 $\pm$ 0.026	0.458 $\pm$ 0.046	0.46 $\pm$ 0.035	0.463 $\pm$ 0.043
GPx	11.4 $\pm$ 0.81	13.35 $\pm$ 1.67	10.95 $\pm$ 1.43	12.36 $\pm$ 3.04
SOD	9.07 $\pm$ 0.52	9.57 $\pm$ 0.87	6.98 $\pm$ 0.67*	10.6 $\pm$ 1.01**
CAT	2.73 $\pm$ 0.34	2.87 $\pm$ 0.41	1.78 $\pm$ 0.2*	3.03 $\pm$ 0.35

C

Groups	Saline	Cr+Pyr	PKU	PKU+Cr+Pyr
DCFH	13.22 $\pm$ 0.74	14.1 $\pm$ 0.91	14.56 $\pm$ 0.59	14.72 $\pm$ 0.93*
SH	66.43 $\pm$ 2.19	74.19 $\pm$ 9.38	55.08 $\pm$ 3.94*	74.42 $\pm$ 6.3
GSH	0.364 $\pm$ 0.029	0.386 $\pm$ 0.027	0.378 $\pm$ 0.04	0.398 $\pm$ 0.032
GPx	11.98 $\pm$ 0.7	12.18 $\pm$ 1.7	13.58 $\pm$ 1.48 <sup>#</sup>	15.87 $\pm$ 1.68*
SOD	5.4 $\pm$ 0.49	5.9 $\pm$ 0.38	5.84 $\pm$ 0.72	6.22 $\pm$ 0.52
CAT	3.78 $\pm$ 0.51	3.46 $\pm$ 0.63	2.27 $\pm$ 0.22*	3.35 $\pm$ 0.54

Data are expressed as mean  $\pm$  SD for 6 animals in each group. DCFH (2',7'-dihydrodichloro fluorescein oxidation), expressed as nmol of DCF per mg of protein; SH (sulfhydryl content), expressed as nmol TNB/mg protein; GSH (reduced glutathione), expressed as nmol of GSH per mg of protein; GPx (glutathione peroxidase), expressed as  $\mu$ mol of NADPH per min per mg of protein; SOD (superoxide dismutase), expressed as SOD U per mg of protein; CAT (catalase), expressed as CAT U per mg of protein. \* $p$ <0.005 compared to the other groups; \*\* $p$ <0.05 compared to saline and PKU; <sup>#</sup>equal to Cr+Pyr+PKU (one-way ANOVA followed by the Tukey test).

Supplemental Table 2: Tukey HSD Comparisons of oxidative stress parameters.

Parameter	Groups (I)	Groups (II)	<i>p</i> values		
			Cerebral cortex	Hippocampus	Cerebellum
DCFH	Sal	Cr+Pyr	0,980	0,923	0,344
		PKU	0,002	0,001	0,078
		PKU+Cr+Pyr	0,999	0,750	0,043
	Cr+Pyr	PKU	0,001	0,004	0,805
		PKU+Cr+Pyr	0,957	0,981	0,627
	PKU	PKU+Cr+Pyr	0,002	0,009	0,989
SH	Sal	Cr+Pyr	0,723	0,955	0,155
		PKU	0,041	0,002	0,020
		PKU+Cr+Pyr	0,447	0,988	0,136
	Cr+Pyr	PKU	0,004	0,001	0,000
		PKU+Cr+Pyr	0,966	0,998	1,000
	PKU	PKU+Cr+Pyr	0,001	0,001	0,000
GSH	Sal	Cr+Pyr	0,998	0,931	0,706
		PKU	0,778	0,905	0,900
		PKU+Cr+Pyr	0,912	0,842	0,371
	Cr+Pyr	PKU	0,684	0,931	0,979
		PKU+Cr+Pyr	0,960	1,000	0,934
	PKU	PKU+Cr+Pyr	0,397	0,999	0,762
CAT	Sal	Cr+Pyr	0,999	0,902	0,693
		PKU	0,005	0,001	0,000
		PKU+Cr+Pyr	0,652	0,436	0,453
	Cr+Pyr	PKU	0,004	0,000	0,002
		PKU+Cr+Pyr	0,744	0,828	0,977
	PKU	PKU+Cr+Pyr	0,000	0,000	0,006
SOD	Sal	Cr+Pyr	0,999	0,696	0,482
		PKU	0,484	0,001	0,584
		PKU+Cr+Pyr	0,997	0,015	0,118
	Cr+Pyr	PKU	0,555	0,000	0,998
		PKU+Cr+Pyr	1,000	0,140	0,787
	PKU	PKU+Cr+Pyr	0,603	0,000	0,688
GPx	Sal	Cr+Pyr	0,988	0,289	0,995
		PKU	0,008	0,974	0,253
		PKU+Cr+Pyr	1,000	0,825	0,001
	Cr+Pyr	PKU	0,016	0,144	0,361
		PKU+Cr+Pyr	0,988	0,811	0,001
	PKU	PKU+Cr+Pyr	0,008	0,596	0,057

Supplemental Table 3: Effect of Phe+ $\alpha$ MePhe and Cr+Pyr administration on enzymes activities of phosphoryl transfer network in A) cerebral cortex, B) hippocampus, and C) cerebellum of Wistar rats.

A

Groups	Saline	Cr+Pyr	PKU	PKU+Cr+Pyr
MtCK	1.43 $\pm$ 0.29	1.41 $\pm$ 0.099	1.11 $\pm$ 0.034*	1.4 $\pm$ 0.087
CytCK	2.61 $\pm$ 0.18	2.47 $\pm$ 0.13	1.7 $\pm$ 0.27*	2.54 $\pm$ 0.59
AK	1.33 $\pm$ 0.25	1.71 $\pm$ 0.56	1.39 $\pm$ 0.37	1.5 $\pm$ 0.48
PK	2.47 $\pm$ 0.05	2.62 $\pm$ 0.1	1.68 $\pm$ 0.1*	2.38 $\pm$ 0.2
HK	0.048 $\pm$ 0.008	0.05 $\pm$ 0.01	0.031 $\pm$ 0.003*	0.047 $\pm$ 0.004
GAPDH	1.38 $\pm$ 0.1	1.48 $\pm$ 0.21	1.14 $\pm$ 0.1*	1.51 $\pm$ 0.1

B

Groups	Saline	Cr+Pyr	PKU	PKU+Cr+Pyr
MtCK	0.63 $\pm$ 0.11	0.63 $\pm$ 0.03	0.43 $\pm$ 0.088*	0.61 $\pm$ 0.095
CytCK	1.88 $\pm$ 0.19	1.78 $\pm$ 0.23	1.67 $\pm$ 0.15	1.68 $\pm$ 0.01
AK	1.57 $\pm$ 0.21	1.63 $\pm$ 0.17	1.21 $\pm$ 0.13*	1.6 $\pm$ 0.12
PK	2.59 $\pm$ 0.12	2.48 $\pm$ 0.16	2.1 $\pm$ 0.18*	2.51 $\pm$ 0.17
HK	0.026 $\pm$ 0.002	0.027 $\pm$ 0.005	0.014 $\pm$ 0.004*	0.027 $\pm$ 0.006
GAPDH	1.34 $\pm$ 0.065	1.47 $\pm$ 0.032*	1.32 $\pm$ 0.091	1.43 $\pm$ 0.099

C

Groups	Saline	Cr+Pyr	PKU	PKU+Cr+Pyr
MtCK	0.63 $\pm$ 0.11	0.63 $\pm$ 0.03	0.43 $\pm$ 0.088*	0.61 $\pm$ 0.095
CytCK	1.88 $\pm$ 0.19	1.78 $\pm$ 0.23	1.67 $\pm$ 0.15	1.68 $\pm$ 0.01
AK	1.57 $\pm$ 0.21	1.63 $\pm$ 0.17	1.21 $\pm$ 0.13*	1.6 $\pm$ 0.12
PK	2.59 $\pm$ 0.12	2.48 $\pm$ 0.16	2.1 $\pm$ 0.18*	2.51 $\pm$ 0.17
HK	0.026 $\pm$ 0.002	0.027 $\pm$ 0.005	0.014 $\pm$ 0.004*	0.027 $\pm$ 0.006
GAPDH	1.34 $\pm$ 0.065	1.47 $\pm$ 0.032*	1.32 $\pm$ 0.091	1.43 $\pm$ 0.099

Data are expressed as mean  $\pm$  SD for 6 animals per group. MtCK (mitochondrial creatine kinase) and CytCK (cytosolic creatine kinase) are expressed as  $\mu$ mol of creatine per min per mg of protein; AK (adenylate kinase), expressed as  $\mu$ mol of ATP per min per mg of protein; PK (pyruvate kinase), expressed as  $\mu$ mol of pyruvate per min per mg of protein; HK (hexokinase), expressed as  $\mu$ mol of NADH per min per mg of protein; GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), expressed as  $\mu$ mol of NADH per min per mg of protein. \* $p$ <0.005 compared to the other groups (one-way ANOVA followed by the Tukey test).

Supplemental Table 4: Tukey HSD Comparisons of phosphotransfer enzymes.

Enzyme	Groups (I)	Groups (J)	<i>p</i> values		
			Cerebral cortex	Hippocampus	Cerebellum
MtCK	Sal	Cr+Pyr	0,993	1,000	0,960
		PKU	0,011	0,004	0,020
		PKU+Cr+Pyr	0,983	0,978	0,985
	Cr+Pyr	PKU	0,020	0,004	0,007
		PKU+Cr+Pyr	1,000	0,969	0,999
	PKU	PKU+Cr+Pyr	0,024	0,011	0,009
PK	Sal	Cr+Pyr	0,824	0,617	0,611
		PKU	0,001	0,000	0,014
		PKU+Cr+Pyr	0,954	0,802	0,914
	Cr+Pyr	PKU	0,000	0,003	0,001
		PKU+Cr+Pyr	0,526	0,998	0,935
	PKU	PKU+Cr+Pyr	0,005	0,001	0,003
HK	Sal	Cr+Pyr	0,993	0,991	0,998
		PKU	0,005	0,001	0,000
		PKU+Cr+Pyr	0,995	0,997	0,679
	Cr+Pyr	PKU	0,003	0,001	0,000
		PKU+Cr+Pyr	0,956	1,000	0,772
	PKU	PKU+Cr+Pyr	0,008	0,001	0,003
CytCK	Sal	Cr+Pyr	0,895	0,851	0,202
		PKU	0,001	0,000	0,853
		PKU+Cr+Pyr	0,984	0,134	0,834
	Cr+Pyr	PKU	0,004	0,001	0,602
		PKU+Cr+Pyr	0,985	0,464	0,626
	PKU	PKU+Cr+Pyr	0,002	0,039	1,000
AK	Sal	Cr+Pyr	0,454	0,928	0,202
		PKU	0,996	0,005	0,000
		PKU+Cr+Pyr	0,907	0,993	0,015
	Cr+Pyr	PKU	0,589	0,001	0,001
		PKU+Cr+Pyr	0,838	0,986	0,571
	PKU	PKU+Cr+Pyr	0,970	0,003	0,018
GAPDH	Sal	Cr+Pyr	0,580	0,038	0,635
		PKU	0,031	0,976	0,001
		PKU+Cr+Pyr	0,354	0,168	0,904
	Cr+Pyr	PKU	0,002	0,016	0,020
		PKU+Cr+Pyr	0,977	0,870	0,953
	PKU	PKU+Cr+Pyr	0,001	0,078	0,006

Supplemental Table 5: Tukey HSD Comparisons of brain weight.

Groups (I)	Groups (II)	<i>p</i> values			
		Whole brain	Cerebral cortex	Hippocampus	Cerebellum
Sal	Cr+Pyr	0,169	0,047	0,974	0,615
	PKU	0,000	0,001	0,000	0,000
	PKU+Cr+Pyr	0,000	0,097	0,466	0,000
Cr+Pyr	PKU	0,00	0,000	0,000	0,000
	PKU+Cr+Pyr	0,001	0,000	0,246	0,000
PKU	PKU+Cr+Pyr	0,002	0,235	0,014	0,994

Capítulo IV – Artigo IV

POSSIBLE RAPPORT BETWEEN OXIDATIVE STRESS AND ENERGY METABOLISM  
IN BRAIN OF RATS SUBJECTED TO PHENYLKETONURIA: EFFECTS OF CREATINE  
AND PYRUVATE

*Vanessa Trindade Bortoluzzi, Roberto Farina de Almeida, Bruna Nitzke Minuzzi, Itiane Diehl  
de Franceschi, Emerson André Casali, Clovis Milton Duval Wannmacher*

*Artigo a ser submetido a periódico ainda não definido*

**PARTE III**

## 6. DISCUSSÃO GERAL

A fisiopatologia subjacente ao dano cerebral observado na PKU inclui disfunções na mielinização do sistema nervoso central (Anderson and Leuzzi 2010), síntese reduzida de monoaminas neurotransmissoras, distúrbio do equilíbrio de aminoácidos através da barreira hematoencefálica (Surtees and Blau 2000), alterações da transmissão sináptica glutamatérgica (Martynyuk, Glushakov et al. 2005), estresse oxidativo (Ribas, Sitta et al. 2011), e distúrbios da homeostase energética cerebral (Pietz, Rupp et al. 2003, Wasserstein, Snyderman et al. 2006, Ficicioglu, Dubroff et al. 2013). As altas concentração de Phe podem prejudicar a função cerebral mesmo em pacientes com PKU tratados precocemente, que apresentam prejuízos da função cognitiva (Gonzalez, Gutierrez et al. 2011, Cappelletti, Cotugno et al. 2013, Jahja, Huijbregts et al. 2014, Bilder, Noel et al. 2016). Tais atributos anormais parecem ser uma consequência direta da perda de células neuronais, anormalidades da substância branca, simplificação dendrítica e redução da densidade sináptica promovida pela PKU durante o desenvolvimento cerebral (Bauman and Kemper 1982, Cordero, Trejo et al. 1983, Kornguth, Gilbert-Barness et al. 1992, Dyer, Kendler et al. 1996, Huttenlocher 2000, Hartwig, Gal et al. 2006, Horster, Schwab et al. 2006, Li, Gu et al. 2010, Dos Reis, Rieger et al. 2013, Schlegel, Scholz et al. 2016). O crescimento e arborização de axônios, neuritos e dendritos, bem como comunicação de redes neurais através de sinapses, são processos biológicos de alto consumo de energia, exigindo um suprimento de energia abundante para suportar a síntese aumentada de proteínas e outros componentes celulares e transporte ativo através da membrana celular e compartimentos subcelulares (Harris, Jolivet et al. 2012, Oruganty-Das, Ng et al. 2012, Lu, Cao et al. 2015).

Considerando as alterações relativas à homeostase energética e redox, a geração de espécies oxidativas é intrínseca ao metabolismo energético em células aeróbicas, já que na cadeia de transporte de elétrons ocorre a geração de espécies oxidantes como subprodutos



inevitáveis. O cérebro é notavelmente vulnerável ao desequilíbrio redox, em parte por causa de seu alto consumo de oxigênio, uma vez que responde por 20% do consumo basal de O<sub>2</sub>. A principal razão pela qual o cérebro exige quantidades de O<sub>2</sub> é seu alto requisito de ATP para manter a homeostase de íons intracelulares para realizar aberturas e fechamentos dos canais iônicos necessários à propagação de potenciais de ação e à neurosecreção. Juntamente com a alta demanda de O<sub>2</sub>, o cérebro dispõe de modestas defesas antioxidantes; os níveis de enzimas antioxidantes, como glutathione peroxidases e catalases, são baixos na maioria das regiões do cérebro (Halliwell 1992). Nesse contexto, o estresse oxidativo ganhou tal aceitação como um distúrbio implicado na neuropatogênese da PKU (Ribas, Sitta et al. 2011, Sanayama, Nagasaka et al. 2011, Stepien, Heaton et al. 2017) que biomarcadores de estresse oxidativo específicos para o cérebro<sup>8</sup> recentemente validados, acessíveis em biofluidos, foram propostos para monitorar danos cerebrais oxidativos em pacientes com PKU (Tavana, Amini et al. 2016, Keshavarzi, Rastegar et al. 2018, Rausell, Garcia-Blanco et al. 2019). Além disso, a inativação oxidativa de enzimas glicolíticas é observada em organismos que variam de E. coli a células de mamíferos (Reichmann, Voth et al. 2018) e pode gerar interruptores metabólicos para redirecionar o fluxo de carboidratos da glicólise para a via da pentose fosfato, com o objetivo de restabelecer o equilíbrio redox de NADP(H) citoplasmático (Hildebrandt, Knuesting et al. 2015, Moldogazieva, Mokhosoev et al. 2018).

Neste trabalho usamos Cr+Pyr como tratamento para prevenir o estresse oxidativo e distúrbios relacionados ao metabolismo energético no cérebro de ratos Wistar jovens submetidos a PKU induzida quimicamente. Inicialmente, avaliamos os efeitos da PKU e do tratamento com Cr+Pyr em córtex cerebral, hipocampo e cerebelo de animais de 14 dias, que mostrou que a suplementação com Cr+Pyr foi capaz de prevenir estresse oxidativo e distúrbios

---

<sup>8</sup> A peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados, como ácido araquidônico, ácido docosahexaenóico e ácido adrenico, leva à formação de subprodutos do tipo prostaglandina que podem ser determinados por espectrometria de massa e usados como biomarcadores de danos oxidativo ao sistema nervoso central.

das atividades de enzimas de fosforiltransferência. A seguir, ampliamos o estudo em animais de 21 dias, avaliando também os níveis de nucleotídeo de adenosina nessas estruturas cerebrais, e o comportamento dos animais em campo aberto e o desempenho no rota-rod para acessar os efeitos dos tratamentos na locomoção, ansiedade e coordenação motora.

SOD, CAT e GPx constituem a primeira linha de defesa antioxidante contra espécies reativas através da dismutação de  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$ , que logo é reduzido a oxigênio e água (Salminen and Paul 2014). Não há consenso sobre como a PKU afeta essas enzimas, pois nem todas as 3 enzimas são afetadas ou apresentam um padrão de alteração, quando presente, em todos os estudos (Steiner, Menzel et al. 1982, Sitta, Vanzin et al. 2011, Rocha and Martins 2012, Ekin, Dogan et al. 2018). Em nosso trabalho, as enzimas envolvidas no metabolismo do  $H_2O_2$  exibiram atividade alterada em pelo menos uma das estruturas do cérebro em 14 e 21 dias (Tabela 1), possivelmente levando a distúrbios nos níveis de  $H_2O_2$ . O cotratamento com Cr+Pyr foi capaz de prevenir substancialmente essas alterações.

A própria Phe pode interferir na disponibilidade de ROS. O ataque de radicais  $\bullet OH$  em L-Phe e D-Phe constitui um ensaio sensível para detectar  $\bullet OH$  em sistemas bioquímicos, que produz três Tyr isoméricas, o-Tyr (2-hidroxifenilalanina), m-Tyr (3-hidroxifenilalanina), e p-Tyr (4-hidroxifenilalanina). Os perfis para a hidroxilação da fenilalanina mostram um máximo em pH 5,5 e um mínimo em torno de pH 8, uma faixa que cobre o pH fisiológico (Grootveld and Halliwell 1986, Kaur, Fagerheim et al. 1988, Maskos, Rush et al. 1992). Essa propriedade de L-Phe da captura de radicais  $\bullet OH$  pode ser responsável por níveis de oxidação de DCFH comparáveis ao controle observados no cerebelo em filhotes de 14 dias, e em córtex cerebral e cerebelo de filhotes PKU em 21 dias. Ainda assim, evidências sugerem que a HPA induz a produção de ROS mitocondrial ao reduzir as atividades dos complexos I + III, da succinato desidrogenase e da cadeia respiratória no córtex cerebral de ratos (Rech, Feksa et al. 2002), possivelmente levando à disfunção mitocondrial, mesmo em episódios isolados de elevação de Phe (Dimer, Ferreira et al. 2018). Além disso, as NADPH oxidases (NOX) podem desempenhar

um papel crítico no estresse oxidativo induzido por Phe, pois estudos demonstraram que tanto os ratos quanto os pacientes PKU apresentam atividade aumentada de NOX e produção de superóxido (Lu, Gu et al. 2011, He, Gu et al. 2013, Bortoluzzi, de Franceschi et al. 2014).

Tabela 1. Parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de animais tratados até 14 e 21 dias de vida.

		Main effect PKU				Main effect Cr+Pyr				Interaction PKU by Cr+Pyr			
		F <sup>a</sup>		P		F		P		F		P	
		14	21	14	21	14	21	14	21	14	21	14	21
Cortex	DCFH	11,51	0,15	0,003*	0,703	10,38	0,17	0,004*	0,685	7,16	0,29	0,015*	0,598
	SH	2,97	8,23	0,1	0,009*	14,94	9,51	0,001*	0,006*	5,57	7,73	0,027*	0,012*
	GSH	0,11	0,07	0,749	0,797	1,57	0,47	0,225	0,501	1,04	0,30	0,319	0,593
	CAT	3,94	3,73	0,061	0,068	13,23	5,68	0,002*	0,027*	11,68	5,08	0,003*	0,036*
	SOD	1,17	4,64	0,292	0,044*	0,64	5,52	0,433	0,029*	0,94	6,99	0,344	0,016*
	GPx	5,52	0,55	0,029*	0,468	5,52	1,13	0,029*	0,300	7,88	0,07	0,011*	0,793
Hippocampus	DCFH	12,43	33,04	0,002*	0,000*	4,45	1,20	0,048*	0,287	8,96	14,21	0,007*	0,001*
	SH	9,79	6,45	0,005*	0,019*	12,88	3,56	0,002*	0,074	8,21	5,56	0,010*	0,029*
	GSH	0,41	5,18	0,531	0,034*	0,28	1,14	0,601	0,298	0,10	0,70	0,753	0,412
	CAT	8,04	4,62	0,010*	0,044*	25,09	4,11	0,000*	0,056	16,35	9,93	0,001*	0,005*
	SOD	2,64	8,46	0,120	0,009*	40,64	4,83	0,000*	0,040*	23,29	0,60	0,000*	0,447*
	GPx	0,95	0,00	0,342	0,976	5,29	0,25	0,032	0,622	0,13	1,30	0,723	0,268
Cerebellum	DCFH	12,43	0,30	0,002*	0,592	4,45	0,19	0,048*	0,669	8,96	0,16	0,007*	0,689
	SH	9,79	9,81	0,005*	0,005*	12,88	7,73	0,002*	0,012*	8,21	5,53	0,010*	0,029*
	GSH	0,41	1,92	0,531	0,181	0,28	2,22	0,601	0,152	0,10	1,38	0,753	0,253
	CAT	8,04	17,10	0,010*	0,010*	25,09	11,1	0,000*	0,003*	16,35	37,43	0,001*	0,000*
	SOD	2,64	8,21	0,120	0,010*	40,64	5,43	0,000*	0,030*	23,29	4,74	0,000*	0,042*
	GPx	0,95	15,50	0,342	0,001*	5,29	0,53	0,032*	0,473	0,13	15,06	0,723	0,001*

<sup>a</sup>14 dias F(1,20); 21 dias F(1,28).

O desequilíbrio redox no meio celular pode promover alterações funcionais em proteínas através da modificação de tióis, principalmente através de resíduos de cisteína, que representam o estado mais reduzido de enxofre nas proteínas (grupos sulfidril) (Poole 2015). A conversão de grupos sulfidril em espécies oxidadas ou alquiladas pode atuar como uma chave, alterando as propriedades catalíticas de uma enzima (Klomsiri, Karplus et al. 2011, Poole 2015). Muitas enzimas metabólicas importantes foram identificadas como sujeitas a essa modulação, incluindo CK (Reddy, Jones et al. 2000), PK (Anastasiou, Poulogiannis et al. 2011) e GAPDH

(Ralser, Wamelink et al. 2007). Neste estudo, observamos inibição da PK nas três estruturas cerebrais em ambas idades, enquanto que a atividade de GAPDH respondeu de maneiras particulares em cada estrutura e idade à PKU, sendo esses efeitos prevenidos pelo tratamento com Cr+Pyr. A inibição da PK pode ser induzida por RS e levar ao acúmulo de fosfoenolpiruvato, que se liga diretamente ao domínio catalítico da triosefosfato isomerase, impedindo a interconversão de fosfato de dihidroxiacetona e gliceraldeído-3-fosfato (G3P) (Anastasiou, Poulogiannis et al. 2011, Gruning, Rinnerthaler et al. 2011, Mullarky and Cantley 2015); o pool de G3P pode ser aumentado ainda mais por inativação oxidativa de GAPDH (Grant, Quinn et al. 1999, Ralser, Wamelink et al. 2007, Hildebrandt, Knuesting et al. 2015, Stincone, Prigione et al. 2015). Dessa forma, em condições pró-oxidantes, PK e GAPDH contribuem para um redirecionamento metabólico, permitindo que as células aumentem os níveis e o fluxo de glicose-6-fosfato através da via das pentoses fosfato para gerar NADPH para alimentar sistemas antioxidantes celulares, por exemplo, a reciclagem de GSSG pela glutathione redutase depende da disponibilidade NADPH (Cerdan, Rodrigues et al. 2006, Hildebrandt, Knuesting et al. 2015). No entanto, em um contexto em que HK também aparece inibida, outros mecanismos devem estar envolvidos no redirecionamento metabólico, evento que precisa ter sua participação verificada em estudos futuros sobre os efeitos da PKU no metabolismo cerebral.

A concentração de grupos tiol é um indicador bem estabelecido do balanço redox celular (Ying, Clavreul et al. 2007, Brandes, Schmitt et al. 2009, Paulsen and Carroll 2013), e nosso estudo mostrou que a PKU induziu respostas distintas relacionadas ao conteúdo de sulfidrilas, diminuindo-o em todas as estruturas cerebrais de animais tratados até 14 dias de vida, enquanto houve aumento do conteúdo de sulfidrilas no hipocampo, e diminuição no córtex cerebral e cerebelo, em animais tratados até 21 dias de vida, efeitos prevenidos pelo tratamento conjunto Cr+Pyr. O aumento do conteúdo total de sulfidrilas é possivelmente uma reação celular em resposta à oxidação aumentada de grupos tiol devido à interação com espécies reativas,

consistindo em um estímulo para a síntese de GSH (Lu 2009), que compreende um terço do total de grupos sulfidríla (Dickinson and Forman 2002). De fato a PKU parece induzir um aumento no conteúdo de GSH no hipocampo de animais tratados até 21 dias, o que pode ter contribuído para o aumento do conteúdo total de sulfidrílas. Tais efeitos divergentes da PKU no conteúdo de sulfidrílas podem contribuir para as causas subjacentes à forma como as atividades das enzimas de fosforiltransferência foram afetadas no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo.

A rede de fosforiltransferência é funcionalmente acoplada à fosforilação oxidativa, permitindo a comunicação entre os locais celulares de consumo e produção de ATP (Dzeja and Terzic 2003, Schlattner, Klaus et al. 2016). Como a taxa fisiológica da produção de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria é inversamente proporcional à disponibilidade de ADP citosólico (Cadenas and Davies 2000), essas enzimas também desempenham um papel antioxidante ao reciclar o ADP através da membrana mitocondrial interna. HK, CytCK e MtCK, e AK operam um ciclo ADP/ATP que ajuda na manutenção do  $\Delta\psi_m$  e do  $\Delta\mu H^+$ , impedindo o acúmulo de ROS (Korshunov, Skulachev et al. 1997, da-Silva, Gomez-Puyou et al. 2004, Meyer, Machado et al. 2006, Dzeja and Terzic 2009, Zorova, Popkov et al. 2018). A indução de PKU inibiu pelo menos 2 dessas enzimas no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo em 14 e 21 dias (Tabela 2); divergências observadas entre as respostas enzimáticas em 14 e 21 dias podem estar relacionada às demandas energéticas em diferentes fases do desenvolvimento cerebral. É possível que a prevenção obtida com Cr+Pyr de tais efeitos seja devida à atuação destas substâncias como substrato energético em apoio à manutenção dos pools intracelulares de ATP.

As estruturas e regiões cerebrais apresentam metabolismo energético (Delaney and Geiger 1996, Camandola and Mattson 2017), suscetibilidade a espécies reativas e defesas antioxidantes particulares (Calabrese, Scapagnini et al. 2002, Campese, Sindhu et al. 2007), portanto, é razoável que estruturas distintas apresentem respostas divergentes ao desequilíbrio

energético e ao estresse oxidativo. Estudos demonstraram que Phe tem efeitos regionais divergentes no metabolismo energético cerebral em pacientes e modelos animais; regiões corticais, como córtices pré-frontal, somatossensorial e visual, exibiam hipometabolismo, enquanto regiões dopaminérgicas e subcorticais, incluindo o sistema estriado e límbico, revelavam hipermetabolismo (Ficicioglu, Dubroff et al. 2013, Dienel and Cruz 2016).

Tabela 2. Enzimas de fosforil transferência em cérebro de animais tratados até 14 e 21 dias de vida.

		Main effect PKU				Main effect Cr+Pyr				Interaction PKU by Cr+Pyr			
		F <sup>a</sup>		P		F		P		F		P	
		14	21	14	21	14	21	14	21	14	21	14	21
Cortex	MtCK	6,46	0,10	0,019*	0,760	4,12	0,30	0,056	0,588	5,81	0,85	0,026*	0,367
	CytCK	9,16	8,14	0,007*	0,010*	6,39	3,77	0,020*	0,066	12,38	12,06	0,002*	0,002*
	PK	16,69	7,81	0,001*	0,011*	11,24	2,28	0,003*	0,146	4,55	14,89	0,045*	0,001*
	HK	9,67	10,39	0,006*	0,004*	7,66	5,50	0,012*	0,029*	5,72	4,53	0,027*	0,046*
	AK	0,05	10,74	0,826	0,004*	1,42	2,33	0,248	0,143	0,95	25,28	0,340	0,000*
	GAPDH	3,46	0,44	0,078	0,515	18,07	0,70	0,000*	0,411	5,89	0,30	0,025*	0,589
Hippocampus	MtCK	9,51	11,55	0,006*	0,003*	6,35	5,22	0,020*	0,033	6,00	4,51	0,024*	0,046*
	CytCK	6,39	2,63	0,02*	0,121	0,01	0,30	0,910	0,588	0,87	2,42	0,361	0,588
	PK	12,35	11,98	0,002*	0,002*	5,10	5,55	0,035*	0,029*	15,96	6,95	0,001*	0,016*
	HK	10,61	11,51	0,004*	0,003*	12,60	1,85	0,002*	0,188	9,88	11,93	0,005*	0,003*
	AK	8,86	5,75	0,007*	0,026*	11,26	6,45	0,003*	0,020*	6,21	16,07	0,022*	0,001*
	GAPDH	0,69	7,06	0,415	0,015*	15,15	3,61	0,001*	0,072	0,06	5,62	0,807	0,028*
Cerebellum	MtCK	5,68	7,87	0,027*	0,011*	8,27	2,69	0,009*	0,117	4,75	6,50	0,041*	0,019*
	CytCK	0,008	1,87	0,774	0,187	2,19	0,19	0,154	0,664	2,03	0,12	0,170	0,733
	PK	7,97	18,58	0,011*	0,000*	14,01	9,40	0,001*	0,006*	3,97	6,25	0,060	0,021*
	HK	18,71	2,34	0,000*	0,142	7,48	9,31	0,013*	0,006*	8,79	13,98	0,008*	0,001*
	AK	31,49	12,79	0,000*	0,002*	0,74	8,22	0,399	0,010*	14,18	12,12	0,001*	0,002*
	GAPDH	7,65	11,19	0,012*	0,003*	3,26	2,32	0,086	0,143	12,26	8,52	0,002*	0,008*

<sup>a</sup>14 dias F(1,20); 21 dias F(1,28).

Essa demanda específica de cada região pode estar relacionada aos efeitos aparentemente ansiolíticos da suplementação de Cr+Pyr, percebidos como prevenção da diminuição da locomoção induzida pela PKU, e aumento do número de entradas, distância e tempo gasto na zona central do campo aberto. O tratamento com Cr+Pyr não preveniu os efeitos da PKU na coordenação motora, como mostrou o teste rota-rod. Pode ser relevante considerar

que as taxas de desenvolvimento cerebral pós-natal também variam regionalmente. A massa e o volume cerebrais diminuídos, descritos clinicamente como microcefalia, são uma característica bem descrita da PKU (Pearsen, Gean-Marton et al. 1990, Pfaendner, Reuner et al. 2005, Perez-Duenas, Pujol et al. 2006, Bodner, Aldridge et al. 2012), e nosso modelo a reproduziu essa característica em ambas idades. O cérebro de ratos aumenta mais de 6x em massa desde o nascimento até a idade adulta. O córtex cerebral e o hipocampo seguem esse padrão, enquanto o cerebelo passa por um ganho relativo de massa muito superior, por um fator de 20.7, que concorda com seu desenvolvimento predominantemente pós-natal (Altman 1969, Bandeira, Lent et al. 2009). É possível que nossa intervenção tenha sido insuficiente para atender aos requisitos cerebelares e prevenir os efeitos da PKU na coordenação motora.

Parece mais razoável atribuir os efeitos preventivos obtidos com o cotratamento com Cr+Pyr às propriedades de atuar como substrato energético dessas substâncias do que à sua capacidade de eliminar as ROS, pois nossos resultados sugerem que o metabolismo energético foi mais vulnerável à administração de Phe+ $\alpha$ MePhe (Tabelas 1 e 2). Além disso, a capacidade de uma substância para capturar ROS pode diferir bastante *in vivo* e *in vitro* (Sies 2007). A disponibilidade de Cr para CK permite manter uma relação ADP/ATP favorável para a cadeia respiratória mitocondrial prosseguir a taxas substanciais. Ao impedir a estase da cadeia de transferência de elétrons, a CK reduz a geração local de espécies oxidantes através de uma atividade de reciclagem de ADP (Andres, Ducray et al. 2008, Wallimann, Tokarska-Schlattner et al. 2011). Pyr, um combustível metabólico prontamente oxidado, pode contribuir para evitar distúrbios do potencial de membrana mitocondrial, mantendo a produção de ATP quando esta é comprometida pelo estresse oxidativo (Wang, Perez et al. 2007, Andres, Ducray et al. 2008, Mallet, Olivencia-Yurvati et al. 2018), especialmente em face da inibição da PK induzida pela PKU.

Cr e Pyr são bem descritos na literatura e são considerados substâncias inofensivas. Se os distúrbios observados aqui também comprometerem o metabolismo cerebral de pacientes,

os pacientes com PKU poderiam se beneficiar de intervenções dietéticas que incluam tratar as particularidades redox e energéticas do cérebro relacionadas a este IEM. Conforme proposto por Roe e Mochel (Roe and Mochel 2006), uma terapia anaplerótica, baseada no conceito de que pode haver um déficit de energia em doenças metabólicas hereditárias—tratável através do fornecimento de substratos alternativos—seria de interesse para o manejo dietético da PKU, ainda mais se o redirecionamento metabólico de precursores de carboidratos ocorrer para contrabalançar o estresse oxidativo promovido por Phe.



## 7. CONCLUSÕES

- O modelo de PKU induzido através da administração de Phe+ $\alpha$ MePhe reproduziu a característica cerebral mais marcante da PKU, isto é, a massa cerebral diminuída em 14 e 21 dias; córtex cerebral, hipocampo e cerebelo também apresentaram massa inferior quando comparado a animais do grupo salina. O tratamento com Cr+Pyr não foi capaz de prevenir totalmente essa consequência da PKU;
- mais estudos são necessários para determinar o período de tratamento que melhor reflete o estresse oxidativo e os distúrbios de metabolismo energético observados em células acessíveis em fluidos periféricos de pacientes PKU, e para traçar uma relação desses achados com estresse oxidativo e distúrbios de metabolismo energético cerebrais nesses pacientes;
- conforme esperado, tendo em vista estudos anteriores do nosso grupo, este modelo de PKU induziu estresse oxidativo, ao mesmo tempo em que produziu alterações da atividade enzimática da rede de fosforiltransferência, em cortex cerebral, hipocampo e cerebelo dos animais em ambas idades estudadas. O tratamento com Cr+Pyr pode ser considerado eficiente em prevenir tais alterações, visto que preveniu a maior parte delas nas 3 estruturas;
- aos 21 dias, o grupo PKU também apresentou diminuição da atividade locomotora dos animais, bem como do número de entradas, distância e tempo gasto na zona central do OFT. O cotratamento com Cr+Pyr tem um efeito aparentemente ansiolítico, prevenindo esses efeitos da administração de Phe+ $\alpha$ MePhe sobre o comportamento dos animais;
- animais PKU tratados até 21 dias de vida também apresentaram prejuízo na coordenação motora, como evidenciado pela performance no rota-rod. O tratamento com Cr + Pyr não preveniu os efeitos da PKU na coordenação motora.

## 8. PERSPECTIVAS

O suprimento inadequado de demandas de energia pode restringir eventos fisiológicos subjacentes ao desenvolvimento cerebral. A toxicidade de Phe pode induzir um ambiente intracelular ao qual o metabolismo deve se adaptar, influenciando rotas metabólicas. O estresse oxidativo ganhou tal aceitação como um distúrbio implicado na neuropatogênese da PKU que biomarcadores específicos do cérebro, validados recentemente, acessíveis em biofluidos, foram propostos para monitorar danos cerebrais oxidativos em pacientes com PKU. Além disso, a inativação oxidativa de enzimas glicolíticas é observada em organismos que variam de *E. coli* a células de mamíferos e pode promover desvios metabólicos para redirecionar o fluxo de carboidratos da glicólise para a via da pentose fosfato, com o objetivo de restabelecer o equilíbrio redox de NADPH citoplasmático.

Neste contexto, o próximo passo desse projeto deverá incluir as seguintes análises, a fim de elucidar se Phe interfere nas interações entre o estresse oxidativo e as vias do metabolismo energético cerebral:

- Atividade da fração mitocondrial das demais enzimas de fosfotransferência abordadas neste trabalho (AK, PK, GAPDH e HK mitocondriais);
- Dosar o conteúdo proteico das enzimas de fosfotransferência (western blot) e se estas tiveram sua expressão gênica alterada (PCR);
- Metabolômica: essa análise permite examinar o conjunto completo de metabólitos em uma célula, tecido, órgão ou organismo biológico, que são os produtos finais dos processos celulares, fornecendo indicadores de que rotas metabólicas do cérebro estariam prejudicadas ou favorecidas na PKU;
- Respirometria de alta resolução: as técnicas de respirometria (Oroboros, Seahorse) permitem obter estimativas da taxa metabólica mitocondrial de mitocôndrias isoladas, células permeabilizadas ou tecidos. O acoplamento mitocondrial da oxidação de substrato à

fosforilação do ADP, a fim de produzir ATP livre, requer bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna e transferência de elétrons através da cadeia de transporte de elétrons para o oxigênio como aceptor final. Assim, assumindo que todo o oxigênio consumido é devido a esse processo e que as mitocôndrias estão totalmente acopladas, o consumo máximo de oxigênio é um indicador confiável da produção de ATP mitocondrial.

A partir dessas análises será possível delinear um perfil metabólico do cérebro na PKU, possibilitando focar estudos subsequentes em rotas metabólicas que envolvam metabólitos que porventura se apresentem alterados, e a relação desses substratos com desvios metabólicos cujo objetivo é restabelecer o equilíbrio redox intracelular em situações de estresse oxidativo.

## REFERÊNCIAS

Aine, C. J., L. Sanfratello, J. C. Adair, J. E. Knoefel, A. Caprihan and J. M. Stephen (2011). "Development and decline of memory functions in normal, pathological and healthy successful aging." *Brain Topogr* 24(3-4): 323-339.

Alle, H., A. Roth and J. R. Geiger (2009). "Energy-efficient action potentials in hippocampal mossy fibers." *Science* 325(5946): 1405-1408.

Altman, J. (1969). "Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats." *J Comp Neurol* 136(3): 269-293.

Alvord, E. C., Jr., L. D. Stevenson, F. S. Vogel and R. L. Engle, Jr. (1950). "Neuropathological findings in phenyl-pyruvic oligophrenia (phenyl-ketouria)." *J Neuropathol Exp Neurol* 9(3): 298-310.

Anastasiou, D., G. Pouligiannis, J. M. Asara, M. B. Boxer, J. K. Jiang, M. Shen, G. Bellinger, A. T. Sasaki, J. W. Locasale, D. S. Auld, C. J. Thomas, M. G. Vander Heiden and L. C. Cantley (2011). "Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses." *Science* 334(6060): 1278-1283.

Anderson, P. J. and V. Leuzzi (2010). "White matter pathology in phenylketonuria." *Mol Genet Metab* 99 Suppl 1: S3-9.

Anderson, P. J., S. J. Wood, D. E. Francis, L. Coleman, V. Anderson and A. Boneh (2007). "Are neuropsychological impairments in children with early-treated phenylketonuria (PKU) related to white matter abnormalities or elevated phenylalanine levels?" *Dev Neuropsychol* 32(2): 645-668.

- Andres, R. H., A. D. Ducray, U. Schlattner, T. Wallimann and H. R. Widmer (2008). "Functions and effects of creatine in the central nervous system." *Brain Res Bull* 76(4): 329-343.
- Attwell, D. and S. B. Laughlin (2001). "An energy budget for signaling in the grey matter of the brain." *J Cereb Blood Flow Metab* 21(10): 1133-1145.
- Balaban, R. S. (2002). "Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium." *J Mol Cell Cardiol* 34(10): 1259-1271.
- Balsom, P. D., K. Soderlund, B. Sjodin and B. Ekblom (1995). "Skeletal muscle metabolism during short duration high-intensity exercise: influence of creatine supplementation." *Acta Physiol Scand* 154(3): 303-310.
- Bandeira, F., R. Lent and S. Herculano-Houzel (2009). "Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(33): 14108-14113.
- Bauman, M. L. and T. L. Kemper (1982). "Morphologic and histoanatomic observations of the brain in untreated human phenylketonuria." *Acta Neuropathol* 58(1): 55-63.
- Beal, M. F. (1992). "Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses?" *Ann Neurol* 31(2): 119-130.
- Beal, M. F. (1995). "Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases." *Ann Neurol* 38(3): 357-366.
- Beal, M. F., E. Brouillet, B. G. Jenkins, R. J. Ferrante, N. W. Kowall, J. M. Miller, E. Storey, R. Srivastava, B. R. Rosen and B. T. Hyman (1993). "Neurochemical and histologic

characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid." *J Neurosci* 13(10): 4181-4192.

Bickel, H., J. Gerrard and E. M. Hickmans (1953). "Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria." *Lancet* 265(6790): 812-813.

Bilder, D. A., J. K. Noel, E. R. Baker, W. Irish, Y. Chen, M. J. Merilainen, S. Prasad and B. J. Winslow (2016). "Systematic Review and Meta-Analysis of Neuropsychiatric Symptoms and Executive Functioning in Adults With Phenylketonuria." *Dev Neuropsychol* 41(4): 245-260.

Binek-Singer, P. and T. C. Johnson (1982). "The effects of chronic hyperphenylalaninaemia on mouse brain protein synthesis can be prevented by other amino acids." *Biochem J* 206(2): 407-414.

Binek, P. A., T. C. Johnson and C. J. Kelly (1981). "Effect of alpha-methylphenylalanine and phenylalanine on brain polyribosomes and protein synthesis." *J Neurochem* 36(4): 1476-1484.

Blau, N. (2013). "Sapropterin dihydrochloride for the treatment of hyperphenylalaninurias." *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 9(9): 1207-1218.

Blau, N. (2016). "Genetics of Phenylketonuria: Then and Now." *Hum Mutat* 37(6): 508-515.

Blau, N., C. Bernegger and F. K. Trefz (2003). "Tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninaemia due to homozygous mutations in the phenylalanine hydroxylase gene." *Eur J Pediatr* 162(3): 196.

Blau, N., N. Shen and C. Carducci (2014). "Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art." *Expert Rev Mol Diagn* 14(6): 655-671.

Boado, R. J., J. Y. Li, M. Nagaya, C. Zhang and W. M. Pardridge (1999). "Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(21): 12079-12084.

Bodner, K. E., K. Aldridge, A. J. Moffitt, D. Peck, D. A. White and S. E. Christ (2012). "A volumetric study of basal ganglia structures in individuals with early-treated phenylketonuria." *Mol Genet Metab* 107(3): 302-307.

Bortoluzzi, V. T., I. D. de Franceschi, E. Rieger and C. M. Wannmacher (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." *Neurochem Res* 39(8): 1594-1602.

Bosetti, F., F. Brizzi, S. Barogi, M. Mancuso, G. Siciliano, E. A. Tendi, L. Murri, S. I. Rapoport and G. Solaini (2002). "Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* 23(3): 371-376.

Bove, J., D. Prou, C. Perier and S. Przedborski (2005). "Toxin-induced models of Parkinson's disease." *NeuroRx* 2(3): 484-494.

Brandes, N., S. Schmitt and U. Jakob (2009). "Thiol-based redox switches in eukaryotic proteins." *Antioxid Redox Signal* 11(5): 997-1014.

Brouillet, E., P. Hantraye, R. J. Ferrante, R. Dolan, A. Leroy-Willig, N. W. Kowall and M. F. Beal (1995). "Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(15): 7105-7109.

Burlina, A. B., L. Bonafe, V. Ferrari, A. Suppiej, F. Zacchello and A. P. Burlina (2000). "Measurement of neurotransmitter metabolites in the cerebrospinal fluid of phenylketonuric patients under dietary treatment." *J Inherit Metab Dis* 23(4): 313-316.

Butler, I. J., M. E. O'Flynn, W. E. Seifert, Jr. and R. R. Howell (1981). "Neurotransmitter defects and treatment of disorders of hyperphenylalaninemia." *J Pediatr* 98(5): 729-733.

Cadenas, E. and K. J. Davies (2000). "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging." *Free Radic Biol Med* 29(3-4): 222-230.

Calabrese, V., G. Scapagnini, A. Ravagna, R. G. Fariello, A. M. Giuffrida Stella and N. G. Abraham (2002). "Regional distribution of heme oxygenase, HSP70, and glutathione in brain: relevance for endogenous oxidant/antioxidant balance and stress tolerance." *J Neurosci Res* 68(1): 65-75.

Camandola, S. and M. P. Mattson (2017). "Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration." *EMBO J* 36(11): 1474-1492.

Camp, K. M., M. A. Parisi, P. B. Acosta, G. T. Berry, D. A. Bilder, N. Blau, O. A. Bodamer, J. P. Brosco, C. S. Brown, A. B. Burlina, B. K. Burton, C. S. Chang, P. M. Coates, A. C. Cunningham, S. F. Dobrowolski, J. H. Ferguson, T. D. Franklin, D. M. Frazier, D. K. Grange, C. L. Greene, S. C. Groft, C. O. Harding, R. R. Howell, K. L. Huntington, H. D. Hyatt-Knorr, I. P. Jevaji, H. L. Levy, U. Lichter-Konecki, M. L. Lindegren, M. A. Lloyd-Puryear, K. Matalon, A. MacDonald, M. L. McPheeters, J. J. Mitchell, S. Mofidi, K. D. Moseley, C. M. Mueller, A. E. Mulberg, L. S. Nerurkar, B. N. Ogata, A. R. Pariser, S. Prasad, G. Pridjian, S. A. Rasmussen, U. M. Reddy, F. J. Rohr, R. H. Singh, S. M. Sirrs, S. E. Stremer, D. A. Tagle, S. M. Thompson, T. K. Urv, J. R. Utz, F. van Spronsen, J. Vockley, S. E. Waisbren, L. S. Weglicki, D. A. White, C. B. Whitley, B. S. Wilfond, S. Yannicelli and J. M. Young (2014).



"Phenylketonuria Scientific Review Conference: state of the science and future research needs."

Mol Genet Metab 112(2): 87-122.

Campese, V. M., R. K. Sindhu, S. Ye, Y. Bai, N. D. Vaziri and B. Jabbari (2007). "Regional expression of NO synthase, NAD(P)H oxidase and superoxide dismutase in the rat brain." Brain Res 1134(1): 27-32.

Canton, M., D. L. Gall, F. Feillet, C. Bonnemains and A. Roy (2019). "Neuropsychological Profile of Children with Early and Continuously Treated Phenylketonuria: Systematic Review and Future Approaches." J Int Neuropsychol Soc: 1-20.

Cappelletti, S., G. Cotugno, B. M. Goffredo, R. Nicolo, S. M. Bernabei, S. Caviglia and V. Di Ciommo (2013). "Cognitive findings and behavior in children and adolescents with phenylketonuria." J Dev Behav Pediatr 34(6): 392-398.

Cerdan, S., T. B. Rodrigues, A. Sierra, M. Benito, L. L. Fonseca, C. P. Fonseca and M. L. Garcia-Martin (2006). "The redox switch/redox coupling hypothesis." Neurochem Int 48(6-7): 523-530.

Chace, D. H., J. E. Sherwin, S. L. Hillman, F. Lorey and G. C. Cunningham (1998). "Use of phenylalanine-to-tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry to improve newborn screening for phenylketonuria of early discharge specimens collected in the first 24 hours." Clinical Chemistry 44(12): 2405-2409.

Circu, M. L. and T. Y. Aw (2010). "Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis." Free Radic Biol Med 48(6): 749-762.

Collingridge, G. L., S. J. Kehl and H. McLennan (1983). "Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus." *J Physiol* 334: 33-46.

Cordero, M. E., M. Trejo, M. Colombo and V. Aranda (1983). "Histological maturation of the neocortex in phenylketonuric rats." *Early Hum Dev* 8(2): 157-173.

Cortes, M. X. (2015). Modelo de hiperfenilalaninemia induz excitotoxicidade glutamatérgica e alterações gliais em ratos : um estudo utilizando o exercício físico como um possível agente neuroprotetor. Master os Sciences Dissertation UFRGS.

Corti, O. and A. Brice (2013). "Mitochondrial quality control turns out to be the principal suspect in parkin and PINK1-related autosomal recessive Parkinson's disease." *Curr Opin Neurobiol* 23(1): 100-108.

da-Silva, W. S., A. Gomez-Puyou, M. T. de Gomez-Puyou, R. Moreno-Sanchez, F. G. De Felice, L. de Meis, M. F. Oliveira and A. Galina (2004). "Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense: steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria." *J Biol Chem* 279(38): 39846-39855.

Davies, K. J. (2016). "The Oxygen Paradox, oxidative stress, and ageing." *Arch Biochem Biophys* 595: 28-32.

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

de Groot, M. J., M. Hoeksma, D. J. Reijngoud, H. W. de Valk, A. M. Paans, P. J. Sauer and F. J. van Spronsen (2013). "Phenylketonuria: reduced tyrosine brain influx relates to reduced cerebral protein synthesis." *Orphanet J Rare Dis* 8: 133.

de Groot, M. J., P. E. Sijens, D. J. Reijngoud, A. M. Paans and F. J. van Spronsen (2015). "Phenylketonuria: brain phenylalanine concentrations relate inversely to cerebral protein synthesis." *J Cereb Blood Flow Metab* 35(2): 200-205.

de Vries, R. L. and S. Przedborski (2013). "Mitophagy and Parkinson's disease: be eaten to stay healthy." *Mol Cell Neurosci* 55: 37-43.

Delaney, S. M. and J. D. Geiger (1996). "Brain regional levels of adenosine and adenosine nucleotides in rats killed by high-energy focused microwave irradiation." *J Neurosci Methods* 64(2): 151-156.

Diamond, A. (1996). "Evidence for the importance of dopamine for prefrontal cortex functions early in life." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351(1346): 1483-1493; discussion 1494.

Dickinson, D. A. and H. J. Forman (2002). "Cellular glutathione and thiols metabolism." *Biochem Pharmacol* 64(5-6): 1019-1026.

Dienel, G. A. and N. F. Cruz (2016). "Biochemical, Metabolic, and Behavioral Characteristics of Immature Chronic Hyperphenylalanemic Rats." *Neurochem Res* 41(1-2): 16-32.

Dimer, N. W., B. K. Ferreira, J. F. Agostini, M. L. Gomes, L. W. Kist, F. Malgarin, M. Carvalho-Silva, L. M. Gomes, J. Rebelo, M. J. S. Frederico, F. Silva, E. P. Rico, M. R. Bogo, E. L. Streck, G. C. Ferreira and P. F. Schuck (2018). "Brain bioenergetics in rats with acute hyperphenylalaninemia." *Neurochem Int* 117: 188-203.

- Dos Reis, E. A., E. Rieger, S. S. de Souza, A. A. Rasia-Filho and C. M. Wannmacher (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." *Metab Brain Dis* 28(3): 509-517.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." *Physiol Rev* 82(1): 47-95.
- Dyer, C. A., A. Kendler, T. Philibotte, P. Gardiner, J. Cruz and H. L. Levy (1996). "Evidence for central nervous system glial cell plasticity in phenylketonuria." *J Neuropathol Exp Neurol* 55(7): 795-814.
- Dzeja, P. and A. Terzic (2009). "Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing." *Int J Mol Sci* 10(4): 1729-1772.
- Dzeja, P. P., M. M. Redfield, J. C. Burnett and A. Terzic (2000). "Failing energetics in failing hearts." *Curr Cardiol Rep* 2(3): 212-217.
- Dzeja, P. P. and A. Terzic (1998). "Phosphotransfer reactions in the regulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels." *FASEB J* 12(7): 523-529.
- Dzeja, P. P. and A. Terzic (2003). "Phosphotransfer networks and cellular energetics." *J Exp Biol* 206(Pt 12): 2039-2047.
- Dzeja, P. P., R. J. Zeleznikar and N. D. Goldberg (1998). "Adenylate kinase: kinetic behavior in intact cells indicates it is integral to multiple cellular processes." *Mol Cell Biochem* 184(1-2): 169-182.

Ekin, S., M. Dogan, F. Gok and Y. Karakus (2018). "Assessment of antioxidant enzymes, total sialic acid, lipid bound sialic acid, vitamins and selected amino acids in children with phenylketonuria." *Pediatr Res* 84(6): 821-828.

Embury, J. E., C. E. Charron, A. Martynyuk, A. G. Zori, B. Liu, S. F. Ali, N. E. Rowland and P. J. Laipis (2007). "PKU is a reversible neurodegenerative process within the nigrostriatum that begins as early as 4 weeks of age in Pah(enu2) mice." *Brain Res* 1127(1): 136-150.

Embury, J. E., R. R. Reep and P. J. Laipis (2005). "Pathologic and immunohistochemical findings in hypothalamic and mesencephalic regions in the pah(enu2) mouse model for phenylketonuria." *Pediatr Res* 58(2): 283-287.

Evans, S., A. Daly, S. Chahal, J. MacDonald and A. MacDonald (2016). "Food acceptance and neophobia in children with phenylketonuria: a prospective controlled study." *J Hum Nutr Diet* 29(4): 427-433.

Ewald, R. C., K. R. Van Keuren-Jensen, C. D. Aizenman and H. T. Cline (2008). "Roles of NR2A and NR2B in the development of dendritic arbor morphology in vivo." *J Neurosci* 28(4): 850-861.

Ficicioglu, C., J. G. Dubroff, N. Thomas, P. R. Gallagher, J. Burfield, C. Husa, R. Randall and H. Zhuang (2013). "A Pilot Study of Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography Findings in Patients with Phenylketonuria before and during Sapropterin Supplementation." *J Clin Neurol* 9(3): 151-156.

Figley, C. R. and P. W. Stroman (2011). "The role(s) of astrocytes and astrocyte activity in neurometabolism, neurovascular coupling, and the production of functional neuroimaging signals." *Eur J Neurosci* 33(4): 577-588.

Flydal, M. I. and A. Martinez (2013). "Phenylalanine hydroxylase: function, structure, and regulation." *IUBMB Life* 65(4): 341-349.

Fox, K., N. Daw, H. Sato and D. Czepita (1991). "Dark-rearing delays the loss of NMDA-receptor function in kitten visual cortex." *Nature* 350(6316): 342-344.

Fritz, R. R., D. S. Hodgins and C. W. Abell (1976). "Phenylalanine ammonia-lyase. Induction and purification from yeast and clearance in mammals." *J Biol Chem* 251(15): 4646-4650.

Fusetti, F., H. Erlandsen, T. Flatmark and R. C. Stevens (1998). "Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria." *J Biol Chem* 273(27): 16962-16967.

Glushakov, A. V., D. M. Dennis, C. Sumners, C. N. Seubert and A. E. Martynyuk (2003). "L-phenylalanine selectively depresses currents at glutamatergic excitatory synapses." *J Neurosci Res* 72(1): 116-124.

Glushakov, A. V., O. Glushakova, M. Varshney, L. K. Bajpai, C. Sumners, P. J. Laipis, J. E. Embury, S. P. Baker, D. H. Otero, D. M. Dennis, C. N. Seubert and A. E. Martynyuk (2005). "Long-term changes in glutamatergic synaptic transmission in phenylketonuria." *Brain* 128(Pt 2): 300-307.

Go, Y. M., J. D. Chandler and D. P. Jones (2015). "The cysteine proteome." *Free Radic Biol Med* 84: 227-245.

Gonzalez, M. J., A. P. Gutierrez, R. Gassio, M. E. Fuste, M. A. Vilaseca and J. Campistol (2011). "Neurological complications and behavioral problems in patients with phenylketonuria in a follow-up unit." *Mol Genet Metab* 104 Suppl: S73-79.

Grant, C. M., K. A. Quinn and I. W. Dawes (1999). "Differential protein S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoenzymes influences sensitivity to oxidative stress." *Mol Cell Biol* 19(4): 2650-2656.

Green, D. R. and J. C. Reed (1998). "Mitochondria and apoptosis." *Science* 281(5381): 1309-1312.

Greer, P. L. and M. E. Greenberg (2008). "From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function." *Neuron* 59(6): 846-860.

Grootveld, M. and B. Halliwell (1986). "Aromatic hydroxylation as a potential measure of hydroxyl-radical formation in vivo. Identification of hydroxylated derivatives of salicylate in human body fluids." *Biochem J* 237(2): 499-504.

Gruning, N. M., D. Du, M. A. Keller, B. F. Luisi and M. Ralser (2014). "Inhibition of triosephosphate isomerase by phosphoenolpyruvate in the feedback-regulation of glycolysis." *Open Biol* 4: 130232.

Gruning, N. M., M. Rinnerthaler, K. Bluemlein, M. Mulleder, M. M. Wamelink, H. Lehrach, C. Jakobs, M. Breitenbach and M. Ralser (2011). "Pyruvate kinase triggers a metabolic feedback loop that controls redox metabolism in respiring cells." *Cell Metab* 14(3): 415-427.

Haigis, M. C. and B. A. Yankner (2010). "The aging stress response." *Mol Cell* 40(2): 333-344.

Halliwell, B. (1992). "Reactive oxygen species and the central nervous system." *J Neurochem* 59(5): 1609-1623.

Halliwell, B. (1994). "Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?" *Lancet* 344(8924): 721-724.

Halliwell, B. (2007). "Biochemistry of oxidative stress." *Biochem Soc Trans* 35(Pt 5): 1147-1150.

Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1989). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford New York, Clarendon Press; Oxford University Press.

Hanley, W. B. (2011). "Non-PKU mild hyperphenylalaninemia (MHP)--the dilemma." *Mol Genet Metab* 104(1-2): 23-26.

Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." *J Gerontol* 11(3): 298-300.

Harman, D. (1981). "The aging process." *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(11): 7124-7128.

Harris, J. J., R. Jolivet and D. Attwell (2012). "Synaptic energy use and supply." *Neuron* 75(5): 762-777.

Hartwig, C., A. Gal, R. Santer, K. Ullrich, U. Finckh and H. J. Kreienkamp (2006). "Elevated phenylalanine levels interfere with neurite outgrowth stimulated by the neuronal cell adhesion molecule L1 in vitro." *FEBS Lett* 580(14): 3489-3492.

He, Y., X. Gu, L. Lu, L. Liang, J. Gao and X. Zhang (2013). "NOX, the main regulator in oxidative stress in experimental models of phenylketonuria?" *J Pediatr Endocrinol Metab* 26(7-8): 675-682.

Hildebrandt, T., J. Knuesting, C. Berndt, B. Morgan and R. Scheibe (2015). "Cytosolic thiol switches regulating basic cellular functions: GAPDH as an information hub?" *Biol Chem* 396(5): 523-537.



Hockenbery, D., G. Nunez, C. Milliman, R. D. Schreiber and S. J. Korsmeyer (1990). "Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death." *Nature* 348(6299): 334-336.

Hockenbery, D. M., Z. N. Oltvai, X. M. Yin, C. L. Milliman and S. J. Korsmeyer (1993). "Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis." *Cell* 75(2): 241-251.

Hommes, F. A. (1991). "On the mechanism of permanent brain dysfunction in hyperphenylalaninemia." *Biochem Med Metab Biol* 46(3): 277-287.

Hommes, F. A. and J. S. Lee (1990). "The control of 5-hydroxytryptamine and dopamine synthesis in the brain: a theoretical approach." *J Inherit Metab Dis* 13(1): 37-57.

Hommes, F. A. and L. Moss (1992). "Myelin turnover in hyperphenylalaninaemia. A re-evaluation with the HPH-5 mouse." *J Inherit Metab Dis* 15(2): 243-251.

Horster, F., M. A. Schwab, S. W. Sauer, J. Pietz, G. F. Hoffmann, J. G. Okun, S. Kolker and S. Kins (2006). "Phenylalanine reduces synaptic density in mixed cortical cultures from mice." *Pediatr Res* 59(4 Pt 1): 544-548.

Huang, W. J., X. Zhang and W. W. Chen (2016). "Role of oxidative stress in Alzheimer's disease." *Biomed Rep* 4(5): 519-522.

Hughes, J. V. and T. C. Johnson (1978). "Experimentally induced and natural recovery from the effects of phenylalanine on brain protein synthesis." *Biochim Biophys Acta* 517(2): 473-485.

Huttenlocher, P. R. (2000). "The neuropathology of phenylketonuria: human and animal studies." *Eur J Pediatr* 159 Suppl 2: S102-106.

Hyder, F., A. B. Patel, A. Gjedde, D. L. Rothman, K. L. Behar and R. G. Shulman (2006). "Neuronal-glia glucose oxidation and glutamatergic-GABAergic function." *J Cereb Blood Flow Metab* 26(7): 865-877.

Hyland, K., R. A. Surtees, S. J. Heales, A. Bowron, D. W. Howells and I. Smith (1993). "Cerebrospinal fluid concentrations of pterins and metabolites of serotonin and dopamine in a pediatric reference population." *Pediatr Res* 34(1): 10-14.

Ikonomidou, C., F. Bosch, M. Miksa, P. Bittigau, J. Vockler, K. Dikranian, T. I. Tenkova, V. Stefovskaja, L. Turski and J. W. Olney (1999). "Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain." *Science* 283(5398): 70-74.

J.W. Eastman, J. E. S., R. Wong, C.L. Liao, R.J. Currier, F. Lorey, G. Cunningham (2000). "Use of the phenylalanine:tyrosine ratio to test newborns for phenylketonuria in a large public health screening programme." *Journal of Medical Screening* 7(3): 131-135.

Jaggi, L., M. R. Zurfluh, A. Schuler, A. Ponzzone, F. Porta, L. Fiori, M. Giovannini, R. Santer, G. F. Hoffmann, H. Ibel, U. Wendel, D. Ballhausen, M. R. Baumgartner and N. Blau (2008). "Outcome and long-term follow-up of 36 patients with tetrahydrobiopterin deficiency." *Mol Genet Metab* 93(3): 295-305.

Jahja, R., S. C. Huijbregts, L. M. de Sonnevile, J. J. van der Meere and F. J. van Spronsen (2014). "Neurocognitive evidence for revision of treatment targets and guidelines for phenylketonuria." *J Pediatr* 164(4): 895-899 e892.

Jervis, G. A. (1937). "Phenylpyruvic oligophrenia: Introductory study of fifty cases of mental deficiency associated with excretion of phenylpyruvic acid." *Archives of Neurology & Psychiatry* 38(5): 944-963.

Jervis, G. A. (1954). "Phenylpyruvic oligophrenia (phenylketonuria)." *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 33: 259-282.

Jones, D. P. and H. Sies (2015). "The Redox Code." *Antioxid Redox Signal* 23(9): 734-746.

Josephy, H. (1948). "Phenylpyruvic oligophrenia; report on 16 clinical cases and two autopsies." *Ill Med J* 94(2): 107-111.

Joubert, F., J. L. Mazet, P. Mateo and J. A. Hoerter (2002). "31P NMR detection of subcellular creatine kinase fluxes in the perfused rat heart: contractility modifies energy transfer pathways." *J Biol Chem* 277(21): 18469-18476.

Kaufman, S. (1999). "A model of human phenylalanine metabolism in normal subjects and in phenylketonuric patients." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(6): 3160-3164.

Kaur, H., I. Fagerheim, M. Grootveld, A. Puppo and B. Halliwell (1988). "Aromatic hydroxylation of phenylalanine as an assay for hydroxyl radicals: application to activated human neutrophils and to the heme protein leghemoglobin." *Anal Biochem* 172(2): 360-367.

Keshavarzi, F., M. Rastegar, M. Vessal, G. Rafiei Dehbidi, M. Khorsand, A. H. Ganjkarimi and M. A. Takhshid (2018). "Serum ischemia modified albumin is a possible new marker of oxidative stress in phenylketonuria." *Metab Brain Dis* 33(3): 675-680.

Klomsiri, C., P. A. Karplus and L. B. Poole (2011). "Cysteine-based redox switches in enzymes." *Antioxid Redox Signal* 14(6): 1065-1077.

Kluck, R. M., E. Bossy-Wetzel, D. R. Green and D. D. Newmeyer (1997). "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis." *Science* 275(5303): 1132-1136.

Kornguth, S., E. Gilbert-Barness, E. Langer and L. Hegstrand (1992). "Golgi-Kopsch silver study of the brain of a patient with untreated phenylketonuria, seizures, and cortical blindness." *Am J Med Genet* 44(4): 443-448.

Korshunov, S. S., V. P. Skulachev and A. A. Starkov (1997). "High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria." *FEBS Lett* 416(1): 15-18.

Kurian, M. A., P. Gissen, M. Smith, S. Heales, Jr. and P. T. Clayton (2011). "The monoamine neurotransmitter disorders: an expanding range of neurological syndromes." *Lancet Neurol* 10(8): 721-733.

Lammardo, A. M., M. Robert, J. C. Rocha, M. van Rijn, K. Ahring, A. Belanger-Quintana, A. MacDonald, K. Dokoupil, H. G. Ozel, P. Goyens and F. Feillet (2013). "Main issues in micronutrient supplementation in phenylketonuria." *Mol Genet Metab* 110 Suppl: S1-5.

Lee, J. Y., Y. H. Kim and J. Y. Koh (2001). "Protection by pyruvate against transient forebrain ischemia in rats." *J Neurosci* 21(20): RC171.

Levy, H., B. Burton, S. Cederbaum and C. Scriver (2007). "Recommendations for evaluation of responsiveness to tetrahydrobiopterin (BH(4)) in phenylketonuria and its use in treatment." *Mol Genet Metab* 92(4): 287-291.

Levy, H. L., A. Milanowski, A. Chakrapani, M. Cleary, P. Lee, F. K. Trefz, C. B. Whitley, F. Feillet, A. S. Feigenbaum, J. D. Bebchuk, H. Christ-Schmidt, A. Dorenbaum and G. Sapropterin Research (2007). "Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH4) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomised placebo-controlled study." *Lancet* 370(9586): 504-510.

- Li, D., X. Gu, L. Lu and L. Liang (2010). "Effects of phenylalanine on the survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in primary cultures: possible involvement of brain-derived neurotrophic factor." *Mol Cell Biochem* 339(1-2): 1-7.
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri and X. Wang (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." *Cell* 91(4): 479-489.
- Lin, M. T. and M. F. Beal (2006). "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases." *Nature* 443(7113): 787-795.
- Ling, J., M. Kritikos and B. Tiplady (2009). "Cognitive effects of creatine ethyl ester supplementation." *Behav Pharmacol* 20(8): 673-679.
- Lou, H. (1985). "Large doses of tryptophan and tyrosine as potential therapeutic alternative to dietary phenylalanine restriction in phenylketonuria." *Lancet* 2(8447): 150-151.
- Lu, J., Y. Cao, K. Cheng, B. Xu, T. Wang, Q. Yang, Q. Yang, X. Feng and Q. Xia (2015). "Berberine regulates neurite outgrowth through AMPK-dependent pathways by lowering energy status." *Exp Cell Res* 334(2): 194-206.
- Lu, L., X. Gu, D. Li, L. Liang, Z. Zhao and J. Gao (2011). "Mechanisms regulating superoxide generation in experimental models of phenylketonuria: an essential role of NADPH oxidase." *Mol Genet Metab* 104(3): 241-248.
- Lu, S. C. (2009). "Regulation of glutathione synthesis." *Mol Aspects Med* 30(1-2): 42-59.
- Lu, T., Y. Pan, S. Y. Kao, C. Li, I. Kohane, J. Chan and B. A. Yankner (2004). "Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain." *Nature* 429(6994): 883-891.

Magistretti, P. J. and L. Pellerin (1996). "Cellular bases of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging: evidence for a prominent role of astrocytes." *Cereb Cortex* 6(1): 50-61.

Mallet, R. T., A. H. Olivencia-Yurvati and R. Bunger (2018). "Pyruvate enhancement of cardiac performance: Cellular mechanisms and clinical application." *Exp Biol Med (Maywood)* 243(2): 198-210.

Markesbery, W. R. (1999). "The role of oxidative stress in Alzheimer disease." *Arch Neurol* 56(12): 1449-1452.

Martynyuk, A. E., A. V. Glushakov, C. Sumners, P. J. Laipis, D. M. Dennis and C. N. Seubert (2005). "Impaired glutamatergic synaptic transmission in the PKU brain." *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1: S34-42.

Maskos, Z., J. D. Rush and W. H. Koppenol (1992). "The hydroxylation of phenylalanine and tyrosine: a comparison with salicylate and tryptophan." *Arch Biochem Biophys* 296(2): 521-529.

Matsuo, K. and F. Hommes (1987). "Regional distribution of the phenylalanine-sensitive ATP-sulphurylase in brain." *J Inherit Metab Dis* 10(1): 62-65.

Matsuo, K., L. Moss and F. A. Hommes (1987). "Properties of the 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS) synthesizing systems of brain and liver." *Neurochem Res* 12(4): 345-349.

McGee, M. M., O. Greengard and W. E. Knox (1972). "Liver phenylalanine hydroxylase activity in relation to blood concentrations of tyrosine and phenylalanine in the rat." *Biochem J* 127(4): 675-680.

McKean, C. M. (1972). "The effects of high phenylalanine concentrations on serotonin and catecholamine metabolism in the human brain." *Brain Res* 47(2): 469-476.

McMorris, T., R. C. Harris, A. N. Howard, G. Langridge, B. Hall, J. Corbett, M. Dicks and C. Hodgson (2007). "Creatine supplementation, sleep deprivation, cortisol, melatonin and behavior." *Physiol Behav* 90(1): 21-28.

McMorris, T., R. C. Harris, J. Swain, J. Corbett, K. Collard, R. J. Dyson, L. Dye, C. Hodgson and N. Draper (2006). "Effect of creatine supplementation and sleep deprivation, with mild exercise, on cognitive and psychomotor performance, mood state, and plasma concentrations of catecholamines and cortisol." *Psychopharmacology (Berl)* 185(1): 93-103.

Meador, K. J. (2007). "The basic science of memory as it applies to epilepsy." *Epilepsia* 48: 23-25.

Meyer, L. E., L. B. Machado, A. P. Santiago, W. S. da-Silva, F. G. De Felice, O. Holub, M. F. Oliveira and A. Galina (2006). "Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation: antioxidant role of mitochondrial kinase-dependent ADP re-cycling activity." *J Biol Chem* 281(49): 37361-37371.

Miller, D. M., G. R. Buettner and S. D. Aust (1990). "Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions." *Free Radical Biology and Medicine* 8(1): 95-108.

Miranda, F. F., K. Teigen, M. Thorolfsson, R. M. Svebak, P. M. Knappskog, T. Flatmark and A. Martinez (2002). "Phosphorylation and mutations of Ser(16) in human phenylalanine hydroxylase. Kinetic and structural effects." *J Biol Chem* 277(43): 40937-40943.

Moats, R. A., K. D. Moseley, R. Koch and M. Nelson, Jr. (2003). "Brain phenylalanine concentrations in phenylketonuria: research and treatment of adults." *Pediatrics* 112(6 Pt 2): 1575-1579.

Moldogazieva, N. T., I. M. Mokhosoev, N. B. Feldman and S. V. Lutsenko (2018). "ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications." *Free Radic Res* 52(5): 507-543.

Mullarky, E. and L. C. Cantley (2015). *Diverting Glycolysis to Combat Oxidative Stress. Innovative Medicine: Basic Research and Development.* K. Nakao, N. Minato and S. Uemoto. Tokyo: 3-23.

Mutisya, E. M., A. C. Bowling and M. F. Beal (1994). "Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease." *J Neurochem* 63(6): 2179-2184.

Nakamura, H., K. Nakamura and J. Yodoi (1997). "Redox regulation of cellular activation." *Annu Rev Immunol* 15: 351-369.

Neumann, D., U. Schlattner and T. Wallimann (2003). "A molecular approach to the concerted action of kinases involved in energy homeostasis." *Biochem Soc Trans* 31(Pt 1): 169-174.

Newmeyer, D. D., D. M. Farschon and J. C. Reed (1994). "Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria." *Cell* 79(2): 353-364.

Ney, D. M., S. T. Gleason, S. C. van Calcar, E. L. MacLeod, K. L. Nelson, M. R. Etzel, G. M. Rice and J. A. Wolff (2009). "Nutritional management of PKU with glycomacropeptide from cheese whey." *J Inherit Metab Dis* 32(1): 32-39.



Novelli, A., J. A. Reilly, P. G. Lysko and R. C. Henneberry (1988). "Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced." *Brain Res* 451(1-2): 205-212.

Opladen, T., G. F. Hoffmann and N. Blau (2012). "An international survey of patients with tetrahydrobiopterin deficiencies presenting with hyperphenylalaninaemia." *J Inher Metab Dis* 35(6): 963-973.

Oruganty-Das, A., T. Ng, T. Udagawa, E. L. Goh and J. D. Richter (2012). "Translational control of mitochondrial energy production mediates neuron morphogenesis." *Cell Metab* 16(6): 789-800.

Owen, L. and S. I. Sunram-Lea (2011). "Metabolic agents that enhance ATP can improve cognitive functioning: a review of the evidence for glucose, oxygen, pyruvate, creatine, and L-carnitine." *Nutrients* 3(8): 735-755.

Pardridge, W. M. (1998). "Blood-brain barrier carrier-mediated transport and brain metabolism of amino acids." *Neurochem Res* 23(5): 635-644.

Parmeggiani, B. and C. R. Vargas (2018). "Oxidative stress in urea cycle disorders: Findings from clinical and basic research." *Clin Chim Acta* 477: 121-126.

Pascucci, T., D. Andolina, I. L. Mela, D. Conversi, C. Latagliata, R. Ventura, S. Puglisi-Allegra and S. Cabib (2009). "5-Hydroxytryptophan rescues serotonin response to stress in prefrontal cortex of hyperphenylalaninaemic mice." *Int J Neuropsychopharmacol* 12(8): 1067-1079.

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

- Pascucci, T., R. Ventura, S. Puglisi-Allegra and S. Cabib (2002). "Deficits in brain serotonin synthesis in a genetic mouse model of phenylketonuria." *Neuroreport* 13(18): 2561-2564.
- Paulsen, C. E. and K. S. Carroll (2013). "Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery." *Chem Rev* 113(7): 4633-4679.
- Pawlak, V., B. J. Schupp, F. N. Single, P. H. Seeburg and G. Kohr (2005). "Impaired synaptic scaling in mouse hippocampal neurones expressing NMDA receptors with reduced calcium permeability." *J Physiol* 562(Pt 3): 771-783.
- Pearson, K. D., A. D. Gean-Marton, H. L. Levy and K. R. Davis (1990). "Phenylketonuria: MR imaging of the brain with clinical correlation." *Radiology* 177(2): 437-440.
- Penrose, L. and J. H. Quastel (1937). "Metabolic studies in phenylketonuria." *Biochem J* 31(2): 266-274.
- Penrose, L. S. (1939). "PERIPHERAL NERVE TUMOURS IN A CASE OF PHENYLKETONURIA." *The Lancet* 233(6028): 572-573.
- Perez-Duenas, B., J. Pujol, C. Soriano-Mas, H. Ortiz, R. Artuch, M. A. Vilaseca and J. Campistol (2006). "Global and regional volume changes in the brains of patients with phenylketonuria." *Neurology* 66(7): 1074-1078.
- Petanjek, Z., M. Judas, G. Simic, M. R. Rasin, H. B. Uylings, P. Rakic and I. Kostovic (2011). "Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(32): 13281-13286.

Pfaendner, N. H., G. Reuner, J. Pietz, G. Jost, D. Rating, V. A. Magnotta, A. Mohr, B. Kress, K. Sartor and S. Hahnel (2005). "MR imaging-based volumetry in patients with early-treated phenylketonuria." *AJNR Am J Neuroradiol* 26(7): 1681-1685.

Pietz, J. (1998). "Neurological aspects of adult phenylketonuria." *Curr Opin Neurol* 11(6): 679-688.

Pietz, J., R. Kreis, A. Rupp, E. Mayatepek, D. Rating, C. Boesch and H. J. Bremer (1999). "Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria." *J Clin Invest* 103(8): 1169-1178.

Pietz, J., A. Rupp, F. Ebinger, D. Rating, E. Mayatepek, C. Boesch and R. Kreis (2003). "Cerebral energy metabolism in phenylketonuria: findings by quantitative In vivo <sup>31</sup>P MR spectroscopy." *Pediatr Res* 53(4): 654-662.

Poole, L. B. (2015). "The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry." *Free Radic Biol Med* 80: 148-157.

Puglisi-Allegra, S., S. Cabib, T. Pascucci, R. Ventura, F. Cali and V. Romano (2000). "Dramatic brain aminergic deficit in a genetic mouse model of phenylketonuria." *Neuroreport* 11(6): 1361-1364.

Raichle, M. E. and M. A. Mintun (2006). "Brain work and brain imaging." *Annu Rev Neurosci* 29: 449-476.

Rakic, P. (2009). "Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology." *Nat Rev Neurosci* 10(10): 724-735.

Ralsler, M., M. M. Wamelink, A. Kowald, B. Gerisch, G. Heeren, E. A. Struys, E. Klipp, C. Jakobs, M. Breitenbach, H. Lehrach and S. Krobitsch (2007). "Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress." *J Biol* 6(4): 10.

Rani, V., G. Deep, R. K. Singh, K. Palle and U. C. Yadav (2016). "Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies." *Life Sci* 148: 183-193.

Rao, M. S. and M. Jacobson (2006). *Developmental neurobiology*, Springer Science & Business Media.

Rausell, D., A. Garcia-Blanco, P. Correcher, I. Vitoria, M. Vento and C. Chafer-Pericas (2019). "Newly validated biomarkers of brain damage may shed light into the role of oxidative stress in the pathophysiology of neurocognitive impairment in dietary restricted phenylketonuria patients." *Pediatr Res* 85(2): 242-250.

Rech, V. C., L. R. Feksa, C. S. Dutra-Filho, A. T. Wyse, M. Wajner and C. M. Wannmacher (2002). "Inhibition of the mitochondrial respiratory chain by phenylalanine in rat cerebral cortex." *Neurochem Res* 27(5): 353-357.

Reddy, S., A. D. Jones, C. E. Cross, P. S. Wong and A. Van Der Vliet (2000). "Inactivation of creatine kinase by S-glutathionylation of the active-site cysteine residue." *Biochem J* 347 Pt 3: 821-827.

Reichmann, D., W. Voth and U. Jakob (2018). "Maintaining a Healthy Proteome during Oxidative Stress." *Mol Cell* 69(2): 203-213.

Ribas, G. S., A. Sitta, M. Wajner and C. R. Vargas (2011). "Oxidative stress in phenylketonuria: what is the evidence?" *Cell Mol Neurobiol* 31(5): 653-662.

Roberts, S. and B. S. Morelos (1982). "Inhibition of cerebral protein kinase activity and cyclic AMP-dependent ribosomal-protein phosphorylation in experimental hyperphenylalaninaemia." *Biochem J* 202(2): 343-351.

Rocha, J. C. and M. J. Martins (2012). "Oxidative stress in phenylketonuria: future directions." *J Inherit Metab Dis* 35(3): 381-398.

Roe, C. R. and F. Mochel (2006). "Anaplerotic diet therapy in inherited metabolic disease: therapeutic potential." *J Inherit Metab Dis* 29(2-3): 332-340.

Rowland, L. M., R. S. Astur, R. E. Jung, J. R. Bustillo, J. Lauriello and R. A. Yeo (2005). "Selective cognitive impairments associated with NMDA receptor blockade in humans." *Neuropsychopharmacology* 30(3): 633-639.

Saks, V. A., Z. A. Khuchua, E. V. Vasilyeva, O. Belikova and A. V. Kuznetsov (1994). "Metabolic compartmentation and substrate channelling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases in in vivo regulation of cellular respiration--a synthesis." *Mol Cell Biochem* 133-134: 155-192.

Salminen, L. E. and R. H. Paul (2014). "Oxidative stress and genetic markers of suboptimal antioxidant defense in the aging brain: a theoretical review." *Rev Neurosci* 25(6): 805-819.

Sanayama, Y., H. Nagasaka, M. Takayanagi, T. Ohura, O. Sakamoto, T. Ito, M. Ishige-Wada, H. Usui, M. Yoshino, A. Ohtake, T. Yorifuji, H. Tsukahara, S. Hirayama, T. Miida, M. Fukui and Y. Okano (2011). "Experimental evidence that phenylalanine is strongly associated to oxidative stress in adolescents and adults with phenylketonuria." *Mol Genet Metab* 103(3): 220-225.

Saneyoshi, T., D. A. Fortin and T. R. Soderling (2010). "Regulation of spine and synapse formation by activity-dependent intracellular signaling pathways." *Curr Opin Neurobiol* 20(1): 108-115.

Sarkissian, C. N. and A. Gamez (2005). "Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria, where are we now?" *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1: S22-26.

Schlattner, U., A. Klaus, S. Ramirez Rios, R. Guzun, L. Kay and M. Tokarska-Schlattner (2016). "Cellular compartmentation of energy metabolism: creatine kinase microcompartments and recruitment of B-type creatine kinase to specific subcellular sites." *Amino Acids* 48(8): 1751-1774.

Schlegel, G., R. Scholz, K. Ullrich, R. Santer and G. M. Rune (2016). "Phenylketonuria: Direct and indirect effects of phenylalanine." *Exp Neurol* 281: 28-36.

Scriver CR, K. S. (2001). *Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. The metabolic & molecular bases of inherited diseases.* B. A. Scriver CR, Sly WS, Valle D. New York, McGraw-Hill: 1667–1724.

Shefer, S., G. S. Tint, D. Jean-Guillaume, E. Daikhin, A. Kendler, L. B. Nguyen, M. Yudkoff and C. A. Dyer (2000). "Is there a relationship between 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase activity and forebrain pathology in the PKU mouse?" *J Neurosci Res* 61(5): 549-563.

Shulman, R. G., D. L. Rothman, K. L. Behar and F. Hyder (2004). "Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging." *Trends Neurosci* 27(8): 489-495.

Sibson, N. R., J. Shen, G. F. Mason, D. L. Rothman, K. L. Behar and R. G. Shulman (1998). "Functional energy metabolism: in vivo <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy evidence for coupling of

cerebral glucose consumption and glutamatergic neuronal activity." *Dev Neurosci* 20(4-5): 321-330.

Sies, H. (2007). "Total antioxidant capacity: appraisal of a concept." *J Nutr* 137(6): 1493-1495.

Sies, H., C. Berndt and D. P. Jones (2017). "Oxidative Stress." *Annu Rev Biochem* 86: 715-748.

Singh, R. H., A. C. Cunningham, S. Mofidi, T. D. Douglas, D. M. Frazier, D. G. Hook, L. Jeffers, H. McCune, K. D. Moseley, B. Ogata, S. Pendyal, J. Skrabal, P. L. Splett, A. Stembridge, A. Wessel and F. Rohr (2016). "Updated, web-based nutrition management guideline for PKU: An evidence and consensus based approach." *Mol Genet Metab* 118(2): 72-83.

Sitta, A., C. S. Vanzin, G. B. Biancini, V. Manfredini, A. B. de Oliveira, C. A. Wayhs, G. O. Ribas, L. Giugliani, I. V. Schwartz, D. Bohrer, S. C. Garcia, M. Wajner and C. R. Vargas (2011). "Evidence that L-carnitine and selenium supplementation reduces oxidative stress in phenylketonuric patients." *Cell Mol Neurobiol* 31(3): 429-436.

Smith, Q. R. (2000). "Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier." *J Nutr* 130(4S Suppl): 1016S-1022S.

Song, W., J. Chen, A. Petrilli, G. Liot, E. Klinglmayr, Y. Zhou, P. Poquiz, J. Tjong, M. A. Pouladi, M. R. Hayden, E. Masliah, M. Ellisman, I. Rouiller, R. Schwarzenbacher, B. Bossy, G. Perkins and E. Bossy-Wetzel (2011). "Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity." *Nat Med* 17(3): 377-382.

Sosa, V., T. Moline, R. Somoza, R. Paciucci, H. Kondoh and L. L. ME (2013). "Oxidative stress and cancer: an overview." *Ageing Res Rev* 12(1): 376-390.

Steiner, G., H. Menzel, I. Lombeck, F. K. Ohnesorge and H. J. Bremer (1982). "Plasma glutathione peroxidase after selenium supplementation in patients with reduced selenium state." *Eur J Pediatr* 138(2): 138-140.

Stepien, K. M., R. Heaton, S. Rankin, A. Murphy, J. Bentley, D. Sexton and I. P. Hargreaves (2017). "Evidence of Oxidative Stress and Secondary Mitochondrial Dysfunction in Metabolic and Non-Metabolic Disorders." *J Clin Med* 6(7).

Stincone, A., A. Prigione, T. Cramer, M. M. Wamelink, K. Campbell, E. Cheung, V. Olin-Sandoval, N. M. Gruning, A. Kruger, M. Tauqeer Alam, M. A. Keller, M. Breitenbach, K. M. Brindle, J. D. Rabinowitz and M. Ralser (2015). "The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway." *Biol Rev Camb Philos Soc* 90(3): 927-963.

Suh, S. W., K. Aoyama, Y. Matsumori, J. Liu and R. A. Swanson (2005). "Pyruvate administered after severe hypoglycemia reduces neuronal death and cognitive impairment." *Diabetes* 54(5): 1452-1458.

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

Tanner, C. M., F. Kamel, G. W. Ross, J. A. Hoppin, S. M. Goldman, M. Korell, C. Marras, G. S. Bhudhikanok, M. Kasten, A. R. Chade, K. Comyns, M. B. Richards, C. Meng, B. Priestley, H. H. Fernandez, F. Cambi, D. M. Umbach, A. Blair, D. P. Sandler and J. W. Langston (2011). "Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease." *Environ Health Perspect* 119(6): 866-872.



Tavana, S., S. Amini, M. S. Hakhamaneshi, P. Andalibi, M. S. Hajir, A. Ardalan, M. Abdi and A. Fathollahpour (2016). "Prooxidant-antioxidant balance in patients with phenylketonuria and its correlation to biochemical and hematological parameters." *J Pediatr Endocrinol Metab* 29(6): 675-680.

Taylor, E. H. and F. A. Hommes (1983). "Effect of experimental hyperphenylalaninemia on myelin metabolism at later stages of brain development." *Int J Neurosci* 20(3-4): 217-227.

Therrell, B. L., C. D. Padilla, J. G. Loeber, I. Kneisser, A. Saadallah, G. J. Borrajo and J. Adams (2015). "Current status of newborn screening worldwide: 2015." *Semin Perinatol* 39(3): 171-187.

Tian, R., M. E. Christe, M. Spindler, J. C. Hopkins, J. M. Halow, S. A. Camacho and J. S. Ingwall (1997). "Role of MgADP in the development of diastolic dysfunction in the intact beating rat heart." *J Clin Invest* 99(4): 745-751.

Tsukada, H., S. Nishiyama, D. Fukumoto, K. Sato, T. Kakiuchi and E. F. Domino (2005). "Chronic NMDA antagonism impairs working memory, decreases extracellular dopamine, and increases D1 receptor binding in prefrontal cortex of conscious monkeys." *Neuropsychopharmacology* 30(10): 1861-1869.

Underhaug, J., O. Aubi and A. Martinez (2012). "Phenylalanine hydroxylase misfolding and pharmacological chaperones." *Curr Top Med Chem* 12(22): 2534-2545.

Vaillend, C., R. Poirier and S. Laroche (2008). "Genes, plasticity and mental retardation." *Behav Brain Res* 192(1): 88-105.

Valla, J., R. Yaari, A. B. Wolf, Y. Kusne, T. G. Beach, A. E. Roher, J. J. Corneveaux, M. J. Huentelman, R. J. Caselli and E. M. Reiman (2010). "Reduced posterior cingulate

mitochondrial activity in expired young adult carriers of the APOE epsilon4 allele, the major late-onset Alzheimer's susceptibility gene." *J Alzheimers Dis* 22(1): 307-313.

van Deursen, J., A. Heerschap, F. Oerlemans, W. Ruitenbeek, P. Jap, H. ter Laak and B. Wieringa (1993). "Skeletal muscles of mice deficient in muscle creatine kinase lack burst activity." *Cell* 74(4): 621-631.

van Vliet, D., V. M. Bruinenberg, P. N. Mazzola, M. H. van Faassen, P. de Blaauw, I. P. Kema, M. R. Heiner-Fokkema, R. D. van Anholt, E. A. van der Zee and F. J. van Spronsen (2015). "Large Neutral Amino Acid Supplementation Exerts Its Effect through Three Synergistic Mechanisms: Proof of Principle in Phenylketonuria Mice." *PLoS One* 10(12): e0143833.

van Wegberg, A. M. J., A. MacDonald, K. Ahring, A. Belanger-Quintana, N. Blau, A. M. Bosch, A. Burlina, J. Campistol, F. Feillet, M. Gizewska, S. C. Huijbregts, S. Kearney, V. Leuzzi, F. Maillot, A. C. Muntau, M. van Rijn, F. Trefz, J. H. Walter and F. J. van Spronsen (2017). "The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment." *Orphanet J Rare Dis* 12(1): 162.

Walker, J. B. (1979). "Creatine: biosynthesis, regulation, and function." *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 50: 177-242.

Wallimann, T., M. Tokarska-Schlattner and U. Schlattner (2011). "The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine." *Amino Acids* 40(5): 1271-1296.

Wallimann, T., M. Wyss, D. Brdiczka, K. Nicolay and H. M. Eppenberger (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 ( Pt 1): 21-40.

Walter, J. H., F. J. White, S. K. Hall, A. MacDonald, G. Rylance, A. Boneh, D. E. Francis, G. J. Shortland, M. Schmidt and A. Vail (2002). "How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria?" *Lancet* 360(9326): 55-57.

Wang, X., E. Perez, R. Liu, L. J. Yan, R. T. Mallet and S. H. Yang (2007). "Pyruvate protects mitochondria from oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells." *Brain Res* 1132(1): 1-9.

Wasserstein, M. P., S. E. Snyderman, C. Sansaricq and M. S. Buchsbaum (2006). "Cerebral glucose metabolism in adults with early treated classic phenylketonuria." *Mol Genet Metab* 87(3): 272-277.

Watanabe, A., N. Kato and T. Kato (2002). "Effects of creatine on mental fatigue and cerebral hemoglobin oxygenation." *Neurosci Res* 42(4): 279-285.

Wieloch, T. (1985). "Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist." *Science* 230(4726): 681-683.

Williams, R. A., C. D. Mamotte and J. R. Burnett (2008). "Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism." *Clin Biochem Rev* 29(1): 31-41.

Wyss, M., O. Braissant, I. Pischel, G. S. Salomons, A. Schulze, S. Stockler and T. Wallimann (2007). "Creatine and creatine kinase in health and disease--a bright future ahead?" *Subcell Biochem* 46: 309-334.

Wyss, M. and R. Kaddurah-Daouk (2000). "Creatine and creatinine metabolism." *Physiol Rev* 80(3): 1107-1213.

Ying, J., N. Clavreul, M. Sethuraman, T. Adachi and R. A. Cohen (2007). "Thiol oxidation in signaling and response to stress: detection and quantification of physiological and pathophysiological thiol modifications." *Free Radic Biol Med* 43(8): 1099-1108.

Ying, W., Y. Chen, C. C. Alano and R. A. Swanson (2002). "Tricarboxylic acid cycle substrates prevent PARP-mediated death of neurons and astrocytes." *J Cereb Blood Flow Metab* 22(7): 774-779.

Yu, Y. M., J. B. Kim, K. W. Lee, S. Y. Kim, P. L. Han and J. K. Lee (2005). "Inhibition of the cerebral ischemic injury by ethyl pyruvate with a wide therapeutic window." *Stroke* 36(10): 2238-2243.

Zhang, H. and X. F. Gu (2005). "A study of gene expression profiles of cultured embryonic rat neurons induced by phenylalanine." *Metab Brain Dis* 20(1): 61-72.

Zielke, H. R., C. L. Zielke, P. J. Baab and R. M. Collins (2002). "Large neutral amino acids auto exchange when infused by microdialysis into the rat brain: implication for maple syrup urine disease and phenylketonuria." *Neurochem Int* 40(4): 347-354.

Zorova, L. D., V. A. Popkov, E. Y. Plotnikov, D. N. Silachev, I. B. Pevzner, S. S. Jankauskas, V. A. Babenko, S. D. Zorov, A. V. Balakireva, M. Juhaszova, S. J. Sollott and D. B. Zorov (2018). "Mitochondrial membrane potential." *Anal Biochem* 552: 50-59.

Zorzi, G., B. Thony and N. Blau (2002). "Reduced nitric oxide metabolites in CSF of patients with tetrahydrobiopterin deficiency." *J Neurochem* 80(2): 362-364.

## APÊNDICE I – Histórico dos Erros Inatos do Metabolismo

### 1. Erros inatos do metabolismo: de Mendel a Garrod

A descoberta dos Erros Inatos do Metabolismo (EIM) remonta ao início do século XX [1, 2], uma época em que a genética ainda dava seus primeiros passos como ciência da biologia moderna [3]. Foi em 1865/1866, com a publicação do trabalho do austríaco Gregor Johann Mendel sobre hibridização de plantas – *Versuche über Pflanzen-Hybriden* (Experimentos em Híbridos de Plantas) [4, 5] – que se estabeleceu pela primeira vez a base matemática do que viria a ser a ciência genética. A intenção de Mendel não era oferecer leis gerais da hereditariedade, mas apenas a ‘lei de desenvolvimento de híbridos’ em plantas (Fig. 1). Seu trabalho permaneceu largamente desconhecido até 1900, quando três botânicos, Hugo de Vries na Holanda, Carl Correns na Alemanha e Erich von Tschermak na Áustria, redescobriram, independentemente, as leis de Mendel. Desde então, como denota o termo “herança mendeliana”, o trabalho de Mendel foi reconhecido como o primeiro a proporcionar evidências empíricas da hereditariedade [3].

Em 1902, William Bateson, que já havia traduzido o trabalho de Mendel em 1901 e era então o mais proeminente mendeliano, trouxe as leis de Mendel à atenção dos cientistas ingleses [6]. Ele mostrou que a primeira lei de Mendel<sup>9</sup> era aplicável não somente a plantas, mas também a animais. Este livro também introduziu um vocabulário técnico que rapidamente se tornou indispensável para todos os mendelianos: "alelomorfo" (ou simplesmente "alelo"), "homozigoto" e "heterozigoto"; estes termos implicam que para um dado caractere transmitido de forma mendeliana, cada indivíduo tem duas (e exatamente duas) versões físicas do mesmo elemento hereditário - uma ideia que Mendel não sugeriu. Tal cenário fomentou a criação oficial

---

<sup>9</sup> Lei da segregação dos fatores, que postula que uma dada característica é determinada por dois fatores que se separam na formação dos gametas, de forma que cada gameta contenha apenas um fator.

da "genética" como uma disciplina no sentido institucional, com um nome, uma clara rede internacional e um encontro internacional dedicado a ela, em 1906 [7, 8].

William Bateson foi também quem introduziu o médico inglês Sir Archibald Garrod ao trabalho de Mendel e provavelmente influenciou seu pensamento no estudo da alcaptonúria [9]. Com base nas leis de Mendel, Garrod, especialista em doenças metabólicas hereditárias, cunhou o termo 'erros inatos do metabolismo' ao postular que

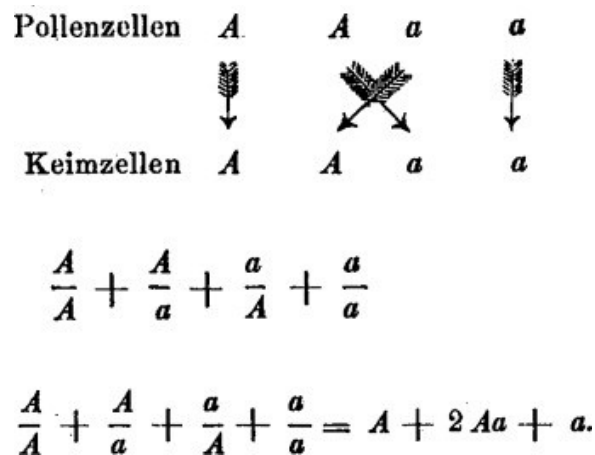


Fig. 2. Três fórmulas usadas por Mendel em seu livro de memórias de 1866 para explicar a proporção observada de um caractere [4]. Os dois progenitores pertencem, respectivamente, ao tipo A e tipo a (por exemplo, ervilhas amarelas e verdes). A é dominante sobre a. A primeira fórmula representa o que acontece durante a fertilização: células polínicas (Pollenzellen) se associam a células ovarianas (Keimzellen). Quatro combinações representadas são equiprováveis, a segunda equação representa o resultado no zigoto (numerador: origem masculina; denominador: origem feminina). A terceira fórmula mostra as proporções de três tipos na progênie: duas formas parentais puras (A e a), e uma forma híbrida Aa. Se cruzadas entre elas, estas Aa darão novamente uma mistura de progênie pura e híbrida. A segunda fórmula mostra como Mendel estava perto do espírito da genética, mas a terceira fórmula mostra que ele não tinha as noções de genótipo e alelo. Na genética mendeliana (aqui distinta de Mendel), o segundo membro da equação seria: AA + 2Aa + aa.

desordens hereditárias seriam resultado da deficiência, ou completa inatividade, de enzimas envolvidas em certas rotas bioquímicas. Garrod propôs um modelo de herança autossômica recessiva, que foi descrito no clássico *Inborn Errors of Metabolism*, publicado em 1909.

Garrod acreditava que o organismo humano não sofre de uma doença quando há homeostase do metabolismo e do catabolismo, ou seja, quando há um equilíbrio estável entre as diferentes reações enzimáticas. Ele considerou que reações enzimáticas adequadamente balanceadas eram fundamentais para se ter uma química saudável [2, 10]. Consistentemente com as proposições de Mendel, Garrod observou em seus pacientes que doenças como a

alcaptonúria, cistinúria, pentosúria e albinismo ocorriam em vários membros de uma mesma família e que os casos eram mais frequentes tratando-se de filhos de pais consanguíneos, mesmo que estes não apresentassem a doença. Ele definiu esse apanhado de observações como constitutivo da "individualidade química"; ele entendia que cada pessoa é bioquimicamente única e que a individualidade resultava de diferentes enzimas que operavam juntas de uma maneira que era comum a todos os indivíduos, mas ao mesmo tempo contribuía para pequenas diferenças entre os mesmos.

Garrod não foi a primeira pessoa a descrever a alcaptonúria, ou a identificar o ácido homogentísico, ou a mostrar que a fenilalanina e a tirosina aumentam a excreção de homogentisato. Mas ele foi o primeiro a colocar todas essas informações juntas, adicionar dados sobre famílias e consangüinidade e, em seguida, propor uma hipótese que levou quase meio século para ser comprovada por outros [9, 11]. A identificação e categorização dos erros inatos do metabolismo feita por Garrod representou um importante avanço conceitual na genética médica do século XX<sup>10</sup>. No entanto, o trabalho de Garrod foi praticamente ignorado até meados do século XX, quando avanços tecnológicos extraordinários, incluindo o desenvolvimento de eletroforese e cromatografia, facilitaram uma série de experimentos que apoiaram sua teoria sobre os EIM [14, 15]. A relação entre os aspectos bioquímicos e genéticos foi elucidada somente em 1941, quando Beadle (geneticista) e Tatum (bioquímico) propuseram a hipótese “um gene - uma enzima” – todos os processos bioquímicos do organismo ocorreriam sob controle gênico e, portanto, mutações gênicas levariam a rotas bioquímicas deficientes [11]. Hoje se sabe que nem todos os genes codificam uma enzima e que algumas enzimas são constituídas por vários polipeptídios curtos codificados por dois ou mais genes.

---

<sup>10</sup> O próprio conceito de ‘enzima’ era recente; a primeira enzima descrita foi a diastase, em 1833, pelos químicos franceses Anselme Payen e Jean-François Persoz 12. Armstrong, E.F., *Enzymes: A Discovery and its Consequences*. Nature, 1933. **131**: p. 535., e o termo ‘enzima’ foi introduzido somente em 1877, pelo fisiologista alemão Wilhelm Kühne 13. Robinson, P.K., *Enzymes: principles and biotechnological applications*. Essays Biochem, 2015. **59**: p. 1-41..

Posteriormente, o trabalho de Linus Pauling sobre a anemia falciforme demonstrou que os genes poderiam alterar qualitativamente a estrutura das proteínas e que as mutações resultam em proteínas estruturalmente diferentes [16], dando origem à era da medicina molecular. Um próximo passo importante na compreensão da função dos genes e da patogênese das desordens genéticas foi dado por Ingram, que mostrou que uma alteração em um gene é de fato responsável por uma mudança na sequência de aminoácidos na proteína correspondente [17, 18]. A ligação entre alterações genéticas e alterações proteicas foi logo estendida para além dos distúrbios monogênicos. Em 1969, Victor McKusick, conhecido como pai da genética médica, postulou que fatores genéticos podem estar envolvidos em todas as doenças [19, 20], antecipando assim em mais de 30 anos a ideia de que todas as doenças humanas têm uma base genética [21, 22].

## 1.2. Doenças Metabólicas Hereditárias

Os erros inatos do metabolismo são os causadores das doenças metabólicas hereditárias [21]. Embora individualmente raros, os EIMs coletivamente representam uma proporção significativa de doenças genéticas, com incidência global superior a 1:1000. Mais de 500 IEMs foram reconhecidos, com aproximadamente 25% deles apresentando manifestações clínicas já no período neonatal [23], mas há também aqueles cujos sintomas podem aparecer na adolescência ou na idade adulta. A prevalência de EIMs na idade adulta é desconhecida, e a maioria dessas doenças é provavelmente subdiagnosticada [24, 25]. Os EIMs podem ser pleiotrópicos e envolver praticamente qualquer órgão ou sistema. Por exemplo, distúrbios da oxidação de ácidos graxos podem apresentar hipoglicemia, rabdomiólise, cardiomiopatia, doença hepática ou mesmo hepatopatia materna durante a gestação de um feto afetado. Gatilhos ambientais específicos são cruciais para determinar um fenótipo individual do paciente; a sintomatologia e manifestações clínicas podem ser diversas e inespecíficas, variando desde



brandas ou nulas até graves e incapacitantes, levar à morte neonatal ou a sérios prejuízos ao sistema nervoso central (SNC), dependendo da rota metabólica envolvida e o tecido afetado [26].

Muitos EIMs são passíveis de tratamentos específicos, incluindo a administração direta da enzima ausente (por exemplo, terapia de reposição enzimática para a doença de Gaucher), estimulação da atividade enzimática residual ou vias alternativas através de cofatores (por exemplo, vitamina B6 na homocistinúria) ou substrato (por exemplo, ácido fólico na deficiência de metileno-tetra-hidrofolato-redutase [MTHFR]). Outra abordagem é diminuir a concentração de um composto tóxico pela prescrição de uma dieta específica (por exemplo, dieta pobre em fenilalanina na fenilcetonúria), inibindo a síntese do composto tóxico (por exemplo, miglustate na doença de Gaucher) ou pelo uso de drogas de depurativas (por exemplo quelantes como o benzoato de sódio nos distúrbios do ciclo da ureia, D-penicilamina na doença de Wilson). Finalmente, certos EIMs podem ser tratados através da substituição de um composto metabólico deficiente (por exemplo, coenzima Q10, serina) [27].

Um dos principais desafios apresentados pelos IEMs é sua extrema diversidade, que sempre dificultou sua classificação. Muitos sistemas informais de classificação foram propostos. O EIM pode ser classificada de acordo com o órgão afetado (como nas doenças neurológicas ou hepáticas), a organela afetada (por exemplo, distúrbios mitocondriais, peroxissômicos ou lisossômicos) ou a idade de apresentação (neonatal ou IEM de início tardio). Como cada uma dessas abordagens é informativa, não existe um sistema de classificação universal único. Neste trabalho optamos por agrupar os EIMs de acordo com a categoria bioquímica (erros inatos envolvendo aminoácidos, metabolismo da glicose, ciclo da ureia, etc.), ao trazer os erros inatos do metabolismo tratáveis que causam deficiência intelectual.

## REFERÊNCIAS

1. Garrod, A.E., *The incidence of alcaptonuria: a study in chemical individuality*. 1902 [classical article]. *Yale J Biol Med*, 2002. **75**(4): p. 221-31.
2. Garrod, A.E. and H. Harris, *Inborn errors of metabolism*. 1909.
3. Portin, P., *The Development of Genetics in the Light of Thomas Kuhn's Theory of Scientific Revolutions*. *Recent Adv DNA Gene Seq*, 2015. **9**(1): p. 14-25.
4. Mendel, G., *Versuche über Pflanzenhybriden*. 1866, Brünn: Verlage des Vereines. 47 p.
5. van Dijk, P.J. and T.H. Ellis, *The Full Breadth of Mendel's Genetics*. *Genetics*, 2016. **204**(4): p. 1327-1336.
6. Bateson, W. and G. Mendel, *Mendel's principles of heredity : a defence*. 1902, Cambridge: University press. xiv p., 1 l., 212 p.
7. Gayon, J., *From Mendel to epigenetics: History of genetics*. *C R Biol*, 2016. **339**(7-8): p. 225-30.
8. Wilks, W. and R.H. Society, *Report of the Third International Conference 1906 on Genetics: Hybridisation (the Cross-breeding of Genera Or Species), the Cross-breeding of Varieties, and General Plant-breeding*. 1809: Royal Horticultural Society.
9. Rosenberg, L.E., *Legacies of Garrod's brilliance. One hundred years--and counting*. *J Inherit Metab Dis*, 2008. **31**(5): p. 574-9.
10. Piro, A., et al., *Archibald Edward Garrod and alcaptonuria: "Inborn errors of metabolism" revisited*. *Genet Med*, 2010. **12**(8): p. 475-6.
11. Beadle, G.W. and E.L. Tatum, *Genetic Control of Biochemical Reactions in Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1941. **27**(11): p. 499-506.

12. Armstrong, E.F., *Enzymes: A Discovery and its Consequences*. Nature, 1933. **131**: p. 535.
13. Robinson, P.K., *Enzymes: principles and biotechnological applications*. Essays Biochem, 2015. **59**: p. 1-41.
14. Lanpher, B., N. Brunetti-Pierri, and B. Lee, *Inborn errors of metabolism: the flux from Mendelian to complex diseases*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(6): p. 449-60.
15. Bearn, A.G., *Archibald Edward Garrod, the reluctant geneticist*. Genetics, 1994. **137**(1): p. 1-4.
16. Pauling, L., H.A. Itano, and et al., *Sickle cell anemia a molecular disease*. Science, 1949. **110**(2865): p. 543-8.
17. Ingram, V.M., *A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin*. Nature, 1956. **178**(4537): p. 792.
18. Ingram, V.M., *Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin*. Nature, 1957. **180**(4581): p. 326-328.
19. Mahloudji, M., et al., *The genetic amyloidoses: With particular reference to hereditary neuropathic amyloidosis, type II (Indiana or Rukavina type)*. Medicine, 1969. **48**(1): p. 1-38.
20. McKusick, V.A., *On lumpers and splitters, or the nosology of genetic disease*. Perspectives in biology and medicine, 1969. **12**(2): p. 298-312.
21. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
22. Jackson, M., et al., *The genetic basis of disease*. Essays Biochem, 2018. **62**(5): p. 643-723.

23. El-Hattab, A.W., *Inborn Errors of Metabolism*. Clinics in Perinatology, 2015. **42**(2): p. 413-439.
24. Gray, R.G., et al., *Inborn errors of metabolism as a cause of neurological disease in adults: an approach to investigation*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2000. **69**(1): p. 5-12.
25. Saudubray, J.M., F. Sedel, and J.H. Walter, *Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: an introduction*. J Inherit Metab Dis, 2006. **29**(2-3): p. 261-74.
26. Scriver, C.R., *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. 2001: McGraw-Hill.
27. Sedel, F., O. Lyon-Caen, and J.M. Saudubray, *Therapy insight: inborn errors of metabolism in adult neurology--a clinical approach focused on treatable diseases*. Nat Clin Pract Neurol, 2007. **3**(5): p. 279-90.

## **APÊNDICE II – Deficiência Intelectual nos Erros Inatos do Metabolismo**

A deficiência intelectual (DI) é uma condição vitalícia e debilitante, definida por um nível de funcionamento intelectual (quociente de inteligência - QI) inferior a 70-75 e limitações significativas em duas ou mais habilidades adaptativas explícitas antes dos 18 anos. A DI é frequentemente associada a problemas comportamentais (autismo, hiperatividade, agressividade e comportamento autolesivo), epilepsia e outras deficiências neurológicas, todas resultando em problemas psicológicos, sociais e encargos econômicos [1]. É uma condição que fica evidente no atraso do desenvolvimento durante a infância ou primeira infância, mas só pode ser formalmente diagnosticada após os 5 anos de idade, quando os testes de QI são confiáveis. Em crianças menores de 5 anos de idade com déficits em dois ou mais domínios de desenvolvimento (por exemplo, habilidades motoras finas/grossas, fala, interação, etc.), o termo atraso global do desenvolvimento (AD) é aplicado [2]. Aqui, usaremos o termo ID coletivamente para ambas as DIs e AD. A DI é frequente, afetando 2-3% das crianças e adultos em todo o mundo, com etiologia diversa, incluindo infecções, traumas e causas tóxicas. Etiologias genéticas constituem as mais frequentes causas e são demonstráveis em mais de 50% dos indivíduos com DI [3], variando de anormalidades cromossômicas numéricas e estruturais, e variações submicroscópicas de número de cópias, a anormalidades de metilação e defeitos de um único gene [4].

Dois grandes grupos de genes relacionados à DI foram delineados: aqueles que levam à programação disfuncional do desenvolvimento neurológico e malformações cerebrais, e aqueles que levam a alterações na organização sináptica molecular e mecanismos de plasticidade [5, 6]. Alguns EIMs parecem influenciar a expressão de um ou outro grupo de genes [7]. As agressões metabólicas também terão consequências diretas que diferem dependendo do período (pré-natal, infância precoce ou tardia, adolescência) em que o defeito metabólico (defeito de energia, intoxicação, armazenamento de substâncias anormais) torna-se

relevante. Os defeitos na produção de energia (como a fosforilação oxidativa) às vezes levam a um amplo espectro de problemas que vão desde anormalidades óbvias da formação do cérebro até anormalidades clínicas sutis. Distúrbios da disponibilidade de energia (como defeitos de transporte de creatina e glicose) não causam malformações cerebrais, mas DI leve à moderada (às vezes associada a traços autistas em defeitos do transporte de creatina). A neurotransmissão aberrante (glicina, serina, distúrbios de aminas biogênicas) pode produzir distúrbios mentais e motores graves. O excesso ou a indisponibilidade de substratos (distúrbios do ciclo da ureia, acidemias orgânicas) causam diferentes graus de deficiência mental, dependendo do nível e da duração da exposição à toxina. Em qualquer caso, e qualquer que seja o mecanismo neurobiológico, uma questão crucial é que o retardo mental pode ser prevenido ou revertido em alguns EIMs tratáveis (Tabela 1).

Tabela 3: Visão geral de todos os 81 EIMs causadores de deficiências intelectuais tratáveis, agrupados de acordo com o fenótipo bioquímico, conforme apresentado em livros-texto padrão (adaptado de van Karnebeek e Stockler, 2012 [8]).

CATEGORIA BIOQUÍMICA	NOME DA DOENÇA	OMIM#	DEFICIÊNCIA BIOQUÍMICA	GENE(S)
AMINOÁCIDOS	Síndrome HHH (hiperornitinemia, hiperamonemia, homocitrulinemia)	238970	Translocase de ornitina	SLC25A15 (AR)
	I.T. Hiperglicinemia não-cetogênica	605899	Aminometiltransferase / glicina descarboxilase / proteína H do sistema de clivagem da glicina	AMT / GLDC / GCSH (AR)
	Fenilcetonúria	261600	Fenilalanina-hidroxilase	PAH (AR)
	Deficiência de PHGDH (deficiência de Serina)	601815	Fosfoglicerato desidrogenase	PHGDH (AR)
	Deficiência de PSAT (deficiência de Serina)	610992	Fosfoserina aminotransferase	PSAT1 (AR)
	Deficiência de PSPH (deficiência de Serina)	614023	Fosfoserina fosfatase	PSPH (AR)
	Tirosinemia tipo II	276600	Tirosina aminotransferase citosólica	TAT (AR)
	Doença da urina do xarope de bordo (variante)	248600	Complexo 2-cetoácido de cadeia ramificada	BCKDHA / BCKDHB / DBT (AR)

COLESTEROL & ÁCIDOS BILIARES	Xantomatose Cerebrotendinosa	213700	Esterol-27-hidroxilase	CYP27A1 (AR)
	Síndrome de Smith-Lemli-Opitz	270400	7-Dehidroxicolesterol redutase	DHCR7 (AR)
CREATINA	Deficiência de AGAT	612718	Arginina: glicina amidinotransferase	GATM (AR)
	Defeito do transportador de creatina	300352	Transportador de creatina	SLC6A8 (ligado ao X)
	Deficiência de GAMT	612736	Guanidino-acetato-N-metiltransferase	GAMT (AR)
ALDEÍDOS GRAXOS	Síndrome de Sjögren-Larsson	270200	Aldeído-graxo-desidrogenase	ALDH3A2 (AR)
TRANSPORTE E REGULAÇÃO DA GLICOSE	Síndrome de deficiência de GLUT1	606777	Transportador de glicose barreira hematoencefálica	SLC2A1 (AD)
	Síndrome de hiperinsulinismo e hiperamonemia	606762	Superatividade da glutamato-desidrogenase	GLUD1 (AR)
HIPER-HOMOCISTEINEMIA	Deficiência de cobalamina C	277400	Metilmalonil-CoA mutase e homocisteína: Metiltransferase metiltetra-hidrofolato	MMACHC (AR)
	Deficiência de cobalamina D	277410	proteína C2ORF25	MMADHC (AR)
	Deficiência de cobalamina E	236270	Metionina-sintetase-redutase	MTRR (AR)
	Deficiência de cobalamina F	277380	Exportador de cobalamina lisossomal	LMBRD1 (AR)
	Deficiência de cobalamina G	250940	5-Metiltetrahidrofolato-homocisteína S-metiltransferase	MTR (AR)
	Homocistinúria	236200	Cistatationa β-sintase	CBS (AR)
	I.T. Deficiência de MTHFR	236250	Deficiência de Metilenotetrahidrofolato-reductase	MTHFR (AR)
LISOSSOMOS	α-Mannosidose	248500	α-Manosidase	MAN2B1 (AR)
	Aspartilglucosaminuria	208400	Aspartilglucosaminidase	AGA (AR)
	Doença de Gaucher tipo III	231000	β-Glucosidase	GBA (AR)
	Síndrome de Hunter (MPS II)	309900	Iduronate-2-sulfatase	IDS (ligada ao X)
	Síndrome de Hurler (MPS I)	607014	α-L-iduronidase	IDUA (AR)
	I.T. Leucodistrofia metacromática	250100	Arilsulfatase A	ARSA (AR)
	Doença de Niemann-Pick tipo C	257220	Transporte intracelular de colesterol e esfingosinas	NPC1 NPC2 (AR)
	Síndrome de Sanfilippo A (MPS IIIa)	252900	Heparan-N-sulfatase	SGSH (AR)
	Síndrome de Sanfilippo B (MPS IIIb)	252920	N-acetil-glicosaminidase	NAGLU (AR)

	Síndrome de Sanfilippo C (MPS IIIc)	252930	Acetil-CoA glucosamina-N-acetil transferase	HGSNAT (AR)
	Síndrome de Sanfilippo D (MPS IIIId)	252940	N-acetil-glucosamina-6-sulfatase	GNS (AR)
	Síndrome de Sly (MPS VII)	253220	$\beta$ -glucuronidase	GUSB (AR)
METAIS	Aceruloplasminemia	604290	Ceruloplasmina (homeostase do ferro)	CP (AR)
	Doença de Menkes / síndrome do chifre occipital	304150	Proteína de transporte de cobre (efluxo da célula)	ATP7A (AR)
	Doença de Wilson	277900	Proteína de transporte de cobre (fígado para bile)	ATP7B (AR)
MITOCONDRIA	Deficiência de coenzima Q10	607426	Coenzima Q2 ou para-hidroxibenzoato de polibenzeniltransferase mitocondrial; aprataxina; subunidade 1 da difosfato-sintase de prenilo; subunidade 2 da difosfato-sintase de prenilo; coenzima Q8; coenzima Q9	COQ2, APTX, PDSS1, PDSS2, CABG1, COQ9 (maioria AR)
	MELAS	540000	Deficiência de energia mitocondrial	MTTL1, MTTQ, MTTH, MTTK, MTTC, MTTT1, MTND1, MTND5, MTND6, MTTT2 (Mt)
	Deficiência do complexo PDH	312170; 245348; 245349	Complexo de piruvato desidrogenase (E1 $\alpha$ , E2, E3)	PDHA1 (ligado ao X), DLAT (AR), PDHX (AR)
NEUROTRANSMISSÃO	Deficiência de DHPR (deficiência de biopterina)	261630	Dihidropterididina-redutase	QDPR (AR)
	Deficiência de GTPCH1 (deficiência de biopterina)	233910	GTP-ciclohidrolase	GCH1 (AR)
	Deficiência de PCD (deficiência de biopterina)	264070	Pterina-4 $\alpha$ -carbinolamina-desidratase	PCBD1 (AR)
	Deficiência de PTSP (deficiência de biopterina)	261640	6-Piruviltetrahydropterina-sintase	PTS (AR)
	Deficiência de SPR (deficiência de biopterina)	612716	Sepiapterina-redutase	SPR (AR)
	Deficiência de SSADH	271980	Semi-aldeído-succínico-desidrogenase	ALDH5A1 (AR)



	Deficiência de tirosina-hidroxilase	605407	Tirosina-hidroxilase	TH (AR)
ÁCIDOS ORGÂNICOS	3-Metilcrotonil glicinúria	210200; 210210	3-Metilcrotonil-CoA-carboxilase (3-MCC)	MCC1 / MCC2 (AR)
	Acidúria 3-metilglutacônica tipo I	250950	3-Metilglutaconil-CoA hidratase	AUH (AR)
	Deficiência de $\beta$ -cetotiolase	203750	Acetoacetyl-CoA tiolase mitocondrial	ACAT1 (AR)
	Deficiência de cobalamina A	251100	Proteína MMAA	MMAA (AR)
	Deficiência de cobalamina B	251110	Cob (I) alamina adenosiltransferase	MMAB (AR)
	Encefalopatia etilmalônica	602473	Dioxigenase de enxofre mitocondrial	ETHE1 (AR)
	I.T. Acidemia glutárica I	231670	Glutaril-CoA-desidrogenase	GCDH (AR)
	Acidemia glutárica II	231680	Desidrogenase múltipla de acil-CoA	ETFA, ETFB, ETFDH (AR)
	Deficiência de HMG-CoA-liase	246450	3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA-liase	HMGCL (AR)
	I.T. Acidemia isovalérica	243500	Isovaleril-CoA-desidrogenase	IVD (AR)
	I.T. Acidemia metilmalônica	251000	Metilmalonil-CoA-mutase	MUT (AR)
	Deficiência de MHBD	300438	2-Metil-3-hidroxi-butiril-CoA-desidrogenase	HSD17B10 (Recessivo ligado ao X)
	Deficiência de mHMG-CoA-sintase	605911	3-hidroxi-3-Metilglutaril-CoA-sintase mitocondrial	HMGCS2 (AR)
	I.T. Acidemia propiônica	606054	Propionil-CoA-carboxilase	PCCA / PCCB (AR)
	Deficiência de SCOT	245050	Succinil-CoA-3-oxoacido-CoA-transferase	OXCT1 (AR)
PEROXISOMOS	Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X	300100	Proteína de membrana do transporte peroxisomal	ALDP ABCD1 (ligado ao X)
PIRIMIDINAS	Superatividade da pirimidina-5-nucleotidase	GENE OMIM # 606224	Superatividade da pirimidina-5-nucleotidase	NT5C3 (AR)
CICLO DA UREIA	I.T. Argininemia	207800	Arginase	ARG1 (AR)
	I.T. Acidúria argininosuccínica	207900	Argininosuccinato-liase	ASL (AR)
	I.T. Citrulinemia	215700	Argininosuccinato-sintetase	ASS1 (AR)
	Citrulinemia tipo II	605814	Citrin (transportador de aspartato-glutamato)	SLC25A13
	I.T. Deficiência de CPS	237300	Carbamil-fosfato-sintetase	CPS1 (AR)
	I.T. Deficiência de NAGS	237310	N-acetilglutamato-sintetase	NAGS (AR)
	I.T. Deficiência OTC	311250	Ornitina-transcarbamilase	OTC (ligada ao X)

VITAMINAS/CO-FATORES	Deficiência de biotinidase	253260	Biotinidase	BTD (AR)
	Doença dos gânglios da base responsivos à biotina	607483	Transporte de biotina	SLC19A3 (AR)
	Deficiência de receptor $\alpha$ de folato cerebral	613068	Transporte de folato cerebral	FOLR1 (AR)
	Deficiência congênita do fator intrínseco	261000	Deficiência intrínseca do fator	GIF (AR)
	Deficiência da holocarboxilase-sintetase	253270	Holocarboxilase-sintetase	HLCS (AR)
	Síndrome de Imerslund Gräsbeck	261100	Defeitos no receptor IF-Cbl	CUBN & AMN (AR)
	Deficiência de cofator de molibdênio tipo A	252150	Sulfito-oxidase e xantina-desidrogenase & aldeído-oxidase	MOCS1, MOCS2, (AR)
	Epilepsia dependente de piridoxina	266100	Piridoxina-fosfato-oxidase	ALDH7A1 (AR)
	Encefalopatia responsiva à tiamina	606152	Transporte de tiamina	SLC19A3 (AR)

I.T. = forma de início tardio. Modo de herança: cada gene é denotado como AD = autossômico dominante, AR = autossômico recessivo, Mt = mitocondrial; Ligado ao X = ligado ao X. OMIM #: denota o número on-line da Herança Mendeliana no Homem ([www.omim.org](http://www.omim.org)) para a doença específica (versus gene), salvo indicação em contrário.

## REFERÊNCIAS

1. Association, A.P., *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®)*. 2013: American Psychiatric Publishing.
2. Shevell, M., *Global developmental delay and mental retardation or intellectual disability: conceptualization, evaluation, and etiology*. *Pediatr Clin North Am*, 2008. 55(5): p. 1071-84, xi.
3. van Karnebeek, C.D., et al., *Etiology of mental retardation in children referred to a tertiary care center: a prospective study*. *Am J Ment Retard*, 2005. 110(4): p. 253-67.
4. Flore, L.A. and J.M. Milunsky, *Updates in the genetic evaluation of the child with global developmental delay or intellectual disability*. *Semin Pediatr Neurol*, 2012. 19(4): p. 173-80.

5. Vaillend, C., R. Poirier, and S. Laroche, *Genes, plasticity and mental retardation*. Behav Brain Res, 2008. 192(1): p. 88-105.
6. Ramocki, M.B. and H.Y. Zoghbi, *Failure of neuronal homeostasis results in common neuropsychiatric phenotypes*. Nature, 2008. 455(7215): p. 912-8.
7. Kahler, S.G. and M.C. Fahey, *Metabolic disorders and mental retardation*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2003. 117C(1): p. 31-41.
8. van Karnebeek, C.D. and S. Stockler, *Treatable inborn errors of metabolism causing intellectual disability: a systematic literature review*. Mol Genet Metab, 2012. 105(3): p. 368-81.

## APÊNDICE III – Histórico da Fenilcetonúria

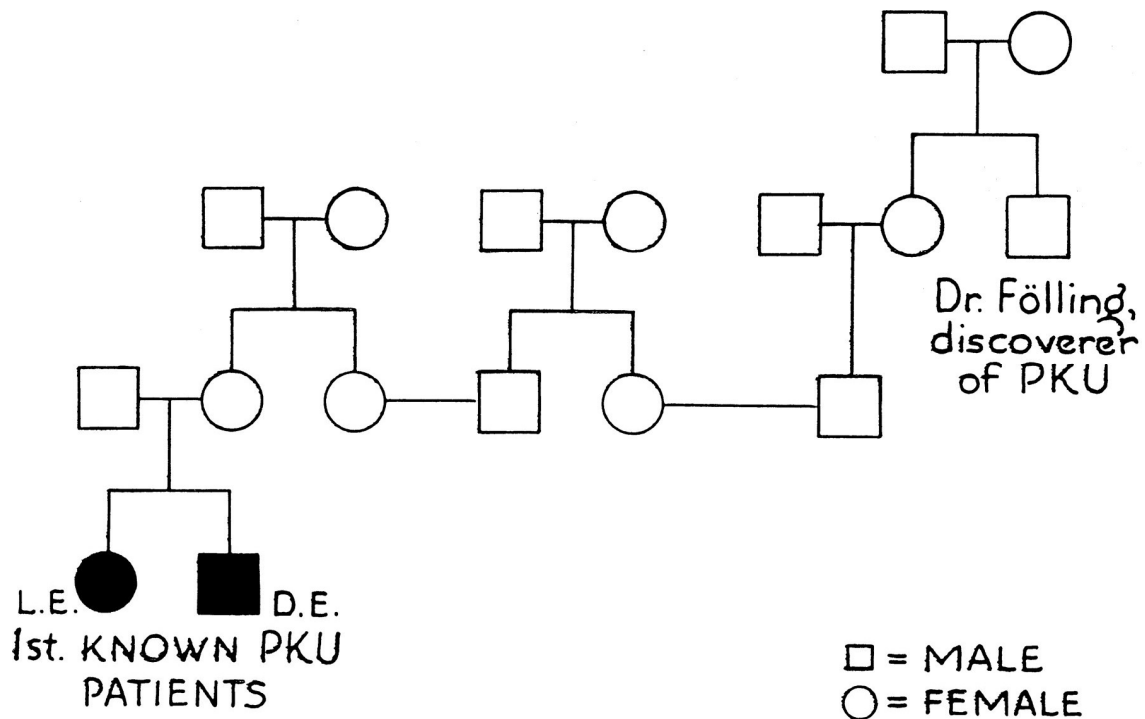
Fenilcetonúria: da descoberta aos dias atuais

A descoberta da fenilcetonúria (PKU) diz respeito tanto ao desenvolvimento das ciências quanto da medicina. Em 1934, Asbjorn Folling reportou a descoberta de uma condição verificável através de teste de urina, para a qual a manifestação era uma profunda deficiência intelectual e do desenvolvimento. A descoberta da PKU sucedeu-se a partir do caso de uma mãe residente em Oslo, Borgny Egeland, com dois filhos severamente deficientes mentais que chegou até Folling; em uma conversa do Sr. Egeland com um colega, o nome do Dr. Følling foi mencionado. O marido da Sra. Egeland, que havia frequentado a faculdade de odontologia e tivera aulas com Folling, lembrou-se de seu interesse em distúrbios metabólicos [1]. Subsequentemente, os Egelands contataram Følling através de um parente em comum (Fig. 2).

Folling formou-se como químico e depois estudou medicina, e era professor pesquisador em nutrição no Hospital Universitário da Noruega. Na primeira metade do século XIX, Følling era um dos poucos indivíduos na Noruega bem treinados em química e medicina. Naquela época, havia uma crescente conscientização do potencial da bioquímica no campo da medicina. Muitos médicos acreditavam, de forma otimista, que quase todo problema poderia ser resolvido por bioquímicos experientes. Foi a época do surgimento da compreensão da bioquímica como mecanismo por detrás de manifestações observadas em condições clínicas de anormalidade.

Ao exame clínico dos irmãos, não encontrou nada relevante, exceto a deficiência intelectual, que estava além de qualquer dúvida. A menina, Liv, de 6 anos e meio de idade, podia dizer algumas palavras, gostava de música, tinha um modo de andar espasmódico e uma maneira excêntrica de se mexer, aparentemente ao acaso. Às vezes ela tinha um enorme apetite, outras vezes nenhum. O menino, Dag, com quase 4 anos de idade, não conseguia falar ou andar,

comer ou beber sozinho, nem conseguia fixar os olhos em nada. Além disso, a Sra. Egeland também reportou o cheiro característico e persistente que impregnava Liv e Dag [2].



Fonte: Siegried and Willard Centerwall, 2000 [3]

Fig. 3: A relação entre o Dr. Fölling e as primeiras crianças portadoras de PKU conhecidas. Sem o conhecimento de ambas as partes na época, eventualmente descobriram que eram parentes distantes pelo casamento - o irmão da esposa do sobrinho de Følling era o marido da irmã da Sra. Egeland. L.E. = Liv Egeland, D.E. = Dag Egeleand.

O exame de urina não mostrou proteína ou glicose. Ele então adicionou um pouco de cloreto férrico às urinas, que era usado para detectar cetonas na urina de diabéticos, portanto, era parte de um exame minucioso de rotina. Ao adicionar cloreto férrico, a cor normalmente fica acastanhada e, quando as cetonas estão presentes, fica roxa ou cor de vinho. Em vez disso, desenvolveu-se uma cor verde profundo nas urinas. Ele não havia visto essa reação antes e, de acordo com seu conhecimento, ela não havia sido descrita na literatura. Esta primeira observação importante suscitou a questão: a reação é reprodutível e persistente? Ele disse à mãe para trazer novas amostras de urina depois de parar todas as formas de

medicação. A reação ainda estava lá e ele concluiu que duas crianças com retardo mental excretavam uma substância não encontrada na urina normal [2].

Mas qual substância? A primeira tarefa foi isolar e purificar a substância. No entanto, isso foi antes da cromatografia, técnica de isótopos, métodos enzimáticos e imunoquímica. A ferramenta da qual Folling dispunha era química orgânica clássica; ele tentou vários procedimentos de extração através dos quais poderia detectar a substância pela formação da cor verde, que resultaram na obtenção de cristais com um ponto de fusão constante, um provável sinal de pureza. Ele então usou análises químicas para determinar a natureza da substância. Usando métodos muito precisos, ele determinou uma fórmula molecular de nove átomos de carbono, oito átomos de hidrogênio e três átomos de oxigênio, de natureza ácida. Em ligeira oxidação, cheirava a benzaldeído. Em uma oxidação mais forte, produzia ácido oxálico que podia ser precipitado por cálcio e ácido benzoico. O ácido fenilpirúvico ajustava-se a todas essas observações. Ele então sintetizou o ácido fenilpirúvico e comparou seu ponto de fusão com o dos cristais: eram idênticos. No entanto, dois compostos diferentes podem ter o mesmo ponto de fusão, mas quando misturados o ponto de fusão se torna menor. A mistura dos dois neste caso não alterou o ponto de fusão, provando a identidade da substância. Portanto, ele concluiu que as duas crianças com retardo mental, irmão e irmã, excretavam ácido fenilpirúvico em sua urina. Pessoas normais não [4].

Era tentador, é claro, especular que havia uma conexão entre o retardo mental e o fenilpiruvato. Outros pacientes com retardo mental excretariam tal substância? Folling coletou amostras de 430 pacientes de diferentes instituições e encontrou reação positiva em oito. A maioria dos pacientes era de pele clara, com tendência ao eczema, ombros largos, figura conrunda e andar espástico. Todos eram mentalmente retardados. Ele então escreveu sobre sua descoberta nestes 10 pacientes, em alemão, na revista *Hoppe Seylers Zeitschrift Für Physiologische Chemie*, em 1934: "Sobre a excreção do ácido fenilpirúvico na urina como uma

anomalia do metabolismo em conexão com o retardo mental". Ele sugeriu o nome "oligofrenia fenilpirúvica". Esta é, sem dúvida, a principal contribuição científica de Folling [1].

Com base na semelhança química, em sua primeira publicação, Folling apresentou a hipótese de que esses pacientes eram incapazes de metabolizar a fenilalanina normalmente. Se assim fosse, seria de se esperar que altos níveis desse aminoácido se acumulassem no sangue. Mas naquela época não havia nenhum método disponível para dosar fenilalanina. Os biólogos Karl Closs e Sverre Dick Henriksen, que eram colegas de Følling, decidiram identificar uma linhagem de bactérias que imitaria a conversão do excesso de fenilalanina em ácido fenilpirúvico. Se essas bactérias pudessem ser identificadas, elas poderiam ser adicionadas a amostras de sangue e a produção resultante de ácido fenilpirúvico poderia ser avaliada usando um método similar àquele usado com urina. Ensaios experimentais confirmaram que a bactéria *Proteus vulgaris* transformava com sucesso a fenilalanina em ácido fenilpirúvico [5]<sup>11</sup>. Os testes subsequentes dos níveis de fenilalanina no sangue de pacientes com PKU confirmaram a teoria inicial de Følling. Junto com este trabalho, Følling e Closs foram capazes de identificar o aumento do débito urinário de ácido fenilacético e fenilalanina em pacientes com PKU. O ácido fenilacético foi considerado responsável pelo odor característico da urina de pacientes PKU não tratados [6].

Uma das últimas grandes contribuições de Følling foi seu trabalho em conceber uma maneira de identificar portadores heterozigotos de PKU. Ele hipotetizou (corretamente) que os portadores seriam menos eficientes em metabolizar o excesso de fenilalanina do que os não portadores homozigotos. Depois de ter obtido a fenilalanina, que na época (1938) era incomum (ele teve que adquiri-la da empresa alemã Schuchhardt) e cara (12 coroas ou US \$ 2,00 por

---

<sup>11</sup> Curiosamente, a justificativa de Closs e Henriksen (1938) para a primeira experiência com *Proteus vulgaris* foi baseada na suposição de que a bactéria era capaz de conversões semelhantes às necessárias. Essa suposição acabou por se revelar imprecisa; em retrospecto, eles perceberam que haviam interpretado mal uma peça crucial da literatura sobre a *Proteus vulgaris*. Se esse erro não tivesse ocorrido, é improvável que Closs e Henriksen tivessem experimentado mais com a bactéria, e muitos outros anos poderiam ter se passado antes de se conceber um meio de medir os níveis de fenilalanina no sangue.

grama), ele mesmo ingeriu uma dose. Sua urina ficou verde com cloreto férrico. Era ele um portador? Seu assistente tomou uma dose, com o mesmo resultado, assim como vários outros; não podiam ser todos portadores, era muito improvável. O que deu errado? Descobriu-se que a fenilalanina era uma mistura racêmica das formas “L” e “D” do aminoácido. Nenhum de nós pode hidroxilar a forma “D” e, portanto, ela acumula-se e transforma-se em ácido fenilpirúvico. Vários anos mais tarde, em 1962, quando finalmente obtiveram uma forma “L” pura, após a administração de uma dose de L-fenilalanina, a urina de portadores continha substancialmente mais ácido fenilpirúvico do que o de não portadores. Isto sugeriu que os portadores são menos eficientes em metabolizar a fenilalanina extra [1].

Em 1935, Lionel Penrose, geneticista e autoridade em retardo mental, escreveu a Sir Archibald Garrod [7], a autoridade sobre erros inatos do metabolismo, para chamar sua atenção ao artigo de Folling. O próprio Penrose reconheceu que a fenilcetonúria, como ele chamava a descoberta de Folling, era a primeira forma de retardo mental a ter uma característica química identificável. Por sua vez, Garrod escreveu a Folling pedindo uma reimpressão e comentando sobre a descoberta<sup>12</sup>. Ao passo que Garrod morreu logo em seguida, Penrose continuou a pesquisar sobre a PKU, e fez dela o tema de sua famosa conferência inaugural<sup>13</sup> como professor da *Galton Professorship of Eugenics* na *University College*, em Londres [9]; Penrose introduziu a ideia de que a PKU talvez pudesse ser tratada e observou que a doença não era distribuída aleatoriamente em populações humanas, nas quais sua frequência de portadores poderia chegar

---

<sup>12</sup> "Estou muito orgulhoso de que o autor de 'Erros Inatos do Metabolismo' queira ter uma reimpressão de todos os artigos sobre a imbecilidade fenilpirúvica. Por enquanto eu coleciono 16 casos da doença neste país." Folling sobre o interesse de Garrod por seu trabalho 1. Christ, S.E., *Asbjorn Folling and the discovery of phenylketonuria*. J Hist Neurosci, 2003. 12(1): p. 44-54..

<sup>13</sup> "Phenylketonuria; a problem in eugenics" – Lionel Penrose foi um importante personagem no distanciamento do estudo da genética de suas origens eugênicas. Ele sucedeu a Karl Pearson e R.A. Fisher como professor da cátedra de Galton de Eugenia na University College London (*Galton Professorship of Eugenics*), cargo que ocupou de 1945 até sua aposentadoria, em 1965. Ele nunca gostou do termo "eugenia": em 1954 ele mudou o título da revista do Galton Laboratory's de 'Annals of Eugenics' para 'Annals of Human Genetics', e em 1963 conseguiu renomear sua cátedra para "Galton Professorship in *Human Genetics*" 8. Valles, S.A., *Lionel Penrose and the concept of normal variation in human intelligence*. Stud Hist Philos Biol Biomed Sci, 2012. 43(1): p. 281-9.



a 2%. Sabe-se hoje que a incidência de PKU é variável, sendo alta na Turquia (cerca de 1 em 2.600 nascimentos) e baixa no Japão (1 em 120.000 nascimentos). A incidência na população caucasiana é de aproximadamente 1: 10.000, dando uma frequência heterozigótica de 1:50 a 1:70 [10].

Uma década depois, Louis Woolf havia traduzido uma ideia que tivera em 1951 [11] em prática, e com Bickel e colegas no Reino Unido e Armstrong e Tyler nos Estados Unidos, o fenótipo químico da PKU mostrou responder à dieta restrição de fenilalanina. Assim, havia um motivo para introduzir o rastreamento populacional para diagnóstico e tratamento precoces, que mais tarde evoluiu para a triagem neonatal que temos hoje.

Em 1963, Seymour Kaufman, pesquisador do *National Institute of Mental Health* em Bethesda, Maryland, elucidou a estrutura da tetrahydrobiopterina, substância já reconhecida como cofator necessário para a conversão de fenilalanina em tirosina pela enzima PAH [12]. Anos mais tarde, na década de 1970, pesquisadores da Austrália, Alemanha, Reino Unido, França e Suíça, juntamente com Kaufman, reportam uma nova forma de PKU, chamada de "HPA maligna" [13], revelando distúrbios tanto na síntese quanto na reciclagem de tetrahydrobiopterina.

Na década de 1980, Woo e colaboradores clonam o DNA complementar (cDNA) para o gene da fenilalanina hidroxilase humana (PAH), mapeando-o no cromossomo 12 (Fig. 3) [14], o que foi catalogado no banco de dados de seqüência genética do *National Institutes of Health*<sup>14</sup>. Na década de 1990, é formado o Consórcio de Análise de Mutações da PAH, realizando a análise de mutações em portadores de PKU em diversas populações humanas, e descobre-se a extensiva heterogeneidade alélica não aleatória da doença (> 500 alelos). Em seguida, organiza-se uma taxonomia padronizada dos alelos, criando o PAHdb, um banco de dados relacional online que registra ambos os alelos patogênicos, causadores de doenças, e alelos benignos no

---

<sup>14</sup> GenBank: NM\_000277 (mRNA); U49897.1 (cDNA)

locus da PAH humana [15]. No final da década de 1990, a enzima PAH é cristalizada e sua estrutura é descrita pela primeira vez (Fig. 4) [16], possibilitando a modelagem molecular de efeitos de mutação *in silico*. Somente em 2001 David Konecki e colegas obtiveram a sequência genômica completa da PAH<sup>15</sup> [17].

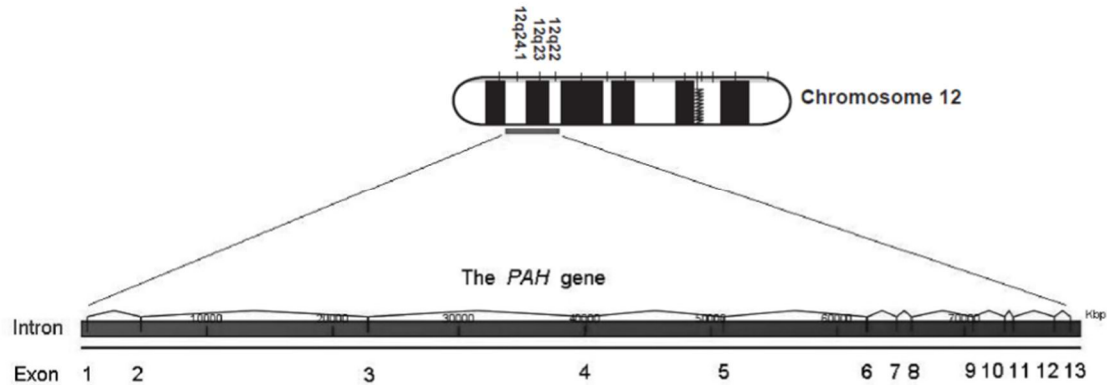


Fig. 4: A estrutura básica do gene humano da PAH. Encontrado no braço longo do cromossomo 12 (12q23.2), o gene humano da PAH contém 13 éxons que codificam um polipeptídeo de 452 aminoácidos [18].

A descoberta da PKU pelo Dr. Asbjørn Følling foi um marco na medicina. A doença e a resposta da comunidade científica a ela é considerada um epítomo da genética bioquímica humana, refletindo a herança autossômica recessiva de Mendel, os EIMs de Garrod e uma interação desadaptativa entre natureza e nutrição enunciada por Galton [19, 20], em que o componente da nutrição é um aminoácido essencial, L-fenilalanina, e o da natureza são as mutações no gene que codifica a enzima L-fenilalanina-hidroxilase (EC 1.14.16.1). A PKU foi a primeira doença a ilustrar como anormalidades metabólicas poderiam ter efeitos neurológicos, e como o tratamento poderia afetar drasticamente as manifestações clínicas do transtorno.

<sup>15</sup> GenBank: AF404777 (gDNA)

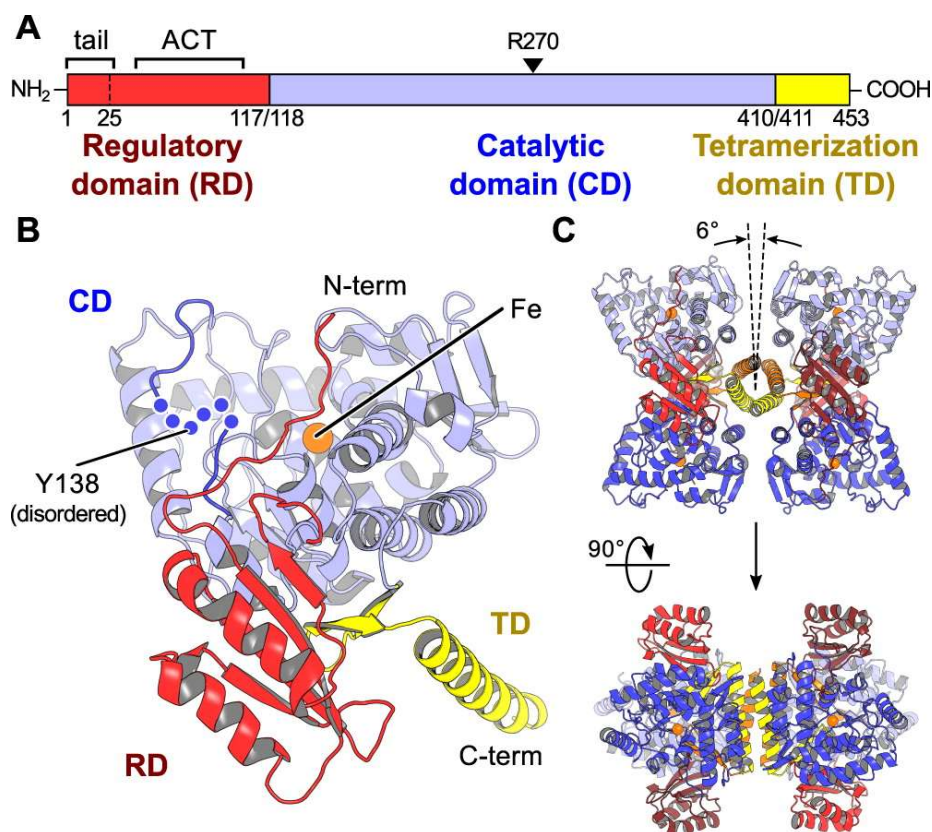


Fig. 5: Estrutura cristalina tetramérica da PAH na ausência de L-Phe ligada. (A) A PAH contém três domínios funcionais – regulatório, catalítico e de tetramerização; (B) Uma cadeia da estrutura cristalina tetramérica. O motivo ACT do domínio regulador (vermelho) está ligado ao domínio catalítico (azul claro) com os resíduos 21-25 da cauda N-terminal que se estende sobre o sítio ativo, que contém o Fe catalítico. Tyr138 e seus resíduos adjacentes são desordenados, em vez de fechados sobre o local ativo; (C) O tetrâmero é um dímero de dímeros assimétrico, sugerindo flexibilidade dentro de uma região dobrada do domínio de tetramerização (amarelo / laranja). Na ausência de L-Phe ligada, existem dois domínios reguladores (vermelho / marrom) em cada face do tetrâmero. Os domínios reguladores não se comunicam entre si [21].

## REFERÊNCIAS

1. Christ, S.E., *Asbjorn Folling and the discovery of phenylketonuria*. J Hist Neurosci, 2003. **12**(1): p. 44-54.
2. Følling, A., O.L. Mohr, and L. Ruud, *Oligophrenia Phenylpyrouvica: A Recessive Syndrome in Man*. 1945: J. Dybwad.
3. Centerwall, S.A. and W.R. Centerwall, *The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two retarded children, and a scientist*. Pediatrics, 2000. **105**(1 Pt 1): p. 89-103.
4. Folling, I., *The discovery of phenylketonuria*. Acta Paediatr Suppl, 1994. **407**: p. 4-10.

5. Henriksen, S.D. and K. Closs, *THE PRODUCTION OF PHENYLPYRUVIC ACID BY BACTERIA*. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica, 1938. **15**(1): p. 101-113.
6. Centerwall, W.R. and S.A. Centerwall, *Phenylketonuria (FOLLING's disease). The story of its discovery*. J Hist Med Allied Sci, 1961. **16**: p. 292-6.
7. Bearn, A.G. and A.E. Garrod, *Archibald Garrod and the individuality of man*. 1993, Oxford: Clarendon Press. xvi, 227 p.
8. Valles, S.A., *Lionel Penrose and the concept of normal variation in human intelligence*. Stud Hist Philos Biol Biomed Sci, 2012. **43**(1): p. 281-9.
9. Penrose, L.S., *Phenylketonuria; a problem in eugenics*. Lancet, 1946. **1**(6409): p. 949-53.
10. Donlon, J., et al., *Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency*. 2015.
11. Woolf, L.I. and D.G. Vulliamy, *Phenylketonuria with a Study of the Effect upon it of Glutamic Acid*. Archives of Disease in Childhood, 1951. **26**(130): p. 487-494.
12. Kaufman, S., *The Structure of the Phenylalanine-Hydroxylation Cofactor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1963. **50**: p. 1085-93.
13. Danks, D.M., et al., *Malignant hyperphenylalaninaemia--current status (June 1977)*. J Inherit Metab Dis, 1978. **1**(2): p. 49-53.
14. Woo, S.L., et al., *Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria*. Nature, 1983. **306**(5939): p. 151-5.
15. Antonarakis, S.E., *Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations*. Nomenclature Working Group. Hum Mutat, 1998. **11**(1): p. 1-3.

16. Erlandsen, H. and R.C. Stevens, *The structural basis of phenylketonuria*. Mol Genet Metab, 1999. **68**(2): p. 103-25.
17. Sriver, C.R., et al., *PAHdb 2003: what a locus-specific knowledgebase can do*. Hum Mutat, 2003. **21**(4): p. 333-44.
18. Williams, R.A., C.D. Mamotte, and J.R. Burnett, *Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism*. Clin Biochem Rev, 2008. **29**(1): p. 31-41.
19. Sriver, C.R. and C.L. Clow, *Phenylketonuria: epitome of human biochemical genetics (first of two parts)*. N Engl J Med, 1980. **303**(23): p. 1336-42.
20. Sriver, C.R. and C.L. Clow, *Phenylketonuria: epitome of human biochemical genetics (second of two parts)*. N Engl J Med, 1980. **303**(24): p. 1394-400.
21. Meisburger, S.P., et al., *Domain Movements upon Activation of Phenylalanine Hydroxylase Characterized by Crystallography and Chromatography-Coupled Small-Angle X-ray Scattering*. J Am Chem Soc, 2016. **138**(20): p. 6506-16.

## APÊNDICE IV – Triagem neonatal

### 1. A fenilcetonúria e o desenvolvimento da triagem neonatal

Mais conhecida como “teste do pezinho”, a triagem neonatal é uma estratégia importante para reduzir a morbidade e mortalidade infantil por meio da detecção precoce de doenças tratáveis que podem levar a quadros clínicos graves. Na década de 1960, o pediatra canadense Robert Guthrie desenvolveu um teste de laboratório simples, compatível com a realização de triagem populacional em recém-nascidos [1]. Dr. Guthrie começou sua carreira como pesquisador oncologista; segundo o relato do próprio Dr. Guthrie, foi o nascimento de seu segundo filho, John, em 1947, que o motivou a pesquisar com o objetivo de prevenir o retardo mental e as deficiências do desenvolvimento; e o nascimento de sua sobrinha, diagnosticada aos 15 meses com PKU, trouxe à sua atenção as causas tratáveis de retardo mental. [2].

Em 1957, Guthrie conheceu o Dr. Robert Warner, diretor do Centro de Reabilitação Infantil de Buffalo. À época, Dr. Warner estava tratando crianças com PKU restringindo a fenilalanina dietética, porém o diagnóstico da doença no início da década de 1960 era realizado pela detecção do ácido fenilpirúvico na urina usando uma reação com cloreto férrico. Embora este teste fosse preciso, ele não era sensível o suficiente para detectar o ácido fenilpirúvico até que danos cerebrais irreversíveis já houvessem ocorrido em muitos casos. Isso era particularmente lamentável porque, na década de 1950, sabia-se que o tratamento da PKU com uma dieta de baixo teor de fenilalanina poderia evitar grande parte da neurotoxicidade associada. Warner propôs a Guthrie que desenvolvesse um método de medir a fenilalanina no sangue. Após apenas 3 dias, Guthrie desenvolveu um método simples para monitorar a fenilalanina no sangue, que envolvia apenas algumas gotas de sangue. O princípio era idêntico ao dos ensaios bacterianos que ele havia usado para pacientes com câncer. Ao modificar os

testes bacterianos desenvolvidos em sua pesquisa sobre o câncer, usados para detectar substâncias circulantes específicas em pacientes oncológicos, ele desenvolveu uma técnica para monitorar os níveis de PKU usando os mesmos princípios de inibição competitiva.

Ele chamou a técnica de "ensaio de inibição bacteriana". O método para detectar níveis aumentados de fenilalanina usando inibição bacteriana é simples: uma cultura padrão de *Bacillus subtilis* é incubada em ágar na presença de um antagonista da fenilalanina (B-2-tienilalanina), que impede o crescimento das bactérias; discos de papel de filtro encharcados (recortados das manchas de sangue seco) são colocados no ágar, e se o excesso de fenilalanina estiver presente no sangue, ele supera a inibição do crescimento e as bactérias se desenvolvem, permitindo a determinação do excesso de fenilalanina com base na quantidade de crescimento bacteriano. Guthrie procurou maneiras de simplificar seu teste, e já em sua primeira tentativa obteve sucesso. Ele descobriu que podia coletar a amostra de sangue para teste diretamente no papel filtro a partir de uma pequena perfuração no calcanhar do bebê, secar a amostra (de sangue) e depois extrair o sangue do papel filtro e prosseguir como de costume com o resto do teste [1]. A fim de testar sua técnica em larga escala, Guthrie obteve permissão para testar cerca de 3.000 residentes de uma escola estadual para portadores de deficiências mentais perto de Rochester. Os administradores da escola afirmaram que todos os seus residentes haviam sido testados com o teste de urina com cloreto férrico, no entanto, Guthrie encontrou 23 casos de PKU, quatro a mais do que os diagnosticados pelos testes de urina [3]. Guthrie estava convencido de que todas as crianças deveriam ser testadas antes de deixarem o hospital, quanto breve possível a partir do nascimento.

Em 1961, Guthrie e seus colaboradores começaram a receber amostras de sangue de recém-nascidos em papel filtro em dois hospitais de Jamestown. Com a demanda evidente, Guthrie recebeu financiamento do Departamento de Crianças dos Estados Unidos para tentar a triagem de recém-nascidos para PKU em todo o território dos Estados Unidos. Isso deu ao Dr. Guthrie os recursos para estabelecer um laboratório dentro de uma pequena casa ao lado do

Hospital Infantil de Buffalo para preparar material para o teste de triagem da PKU. Em dois anos, 400.000 bebês foram testados em 29 estados, sendo 39 casos positivos de PKU; este esforço estabeleceu uma incidência de quase um em 10.000 nascimentos nos Estados Unidos, e possibilitou que a terapia definitiva fosse ofertada a todos os pacientes identificados antes que a neurotoxicidade se estabelecesse [4, 5].

Ainda nos anos 1960, pais de crianças com deficiência intelectual começaram a advogar por leis estaduais para testar todos os recém-nascidos nos Estados Unidos, e as primeiras leis estaduais de triagem neonatal universal foram implementadas. Em 1965, 32 estados americanos decretaram leis de triagem, todos com exceção de 5, tornando o teste obrigatório. Em meados da década de 1970, a triagem para PKU tornou-se rotina em quase todos os países industrializados e chegou até mesmo a muitos países mais pobres, com o objetivo de diagnosticar precocemente e tratar pacientes portadores de PKU, evitando o retardo mental. A PKU tornou-se um protótipo para screening genético em populações humanas [6]. O maior sucesso do desenvolvimento da triagem neonatal para PKU é que isso instigou às pessoas a questionarem se outras doenças poderiam ser prevenidas através de métodos similares de detecção precoce. Logo ficou claro que sim, e no final dos anos 1960, a triagem neonatal para doenças genéticas tornou-se uma parte dos cuidados com a saúde infantil nos Estados Unidos [7].

Os programas de triagem neonatal ao redor do mundo tendem a ser ampliados, à medida que as pesquisas identificam a possibilidade e demanda do diagnóstico precoce de uma dada doença. A seleção de doenças para inclusão em um programa de triagem neonatal baseia-se principalmente em três critérios: a) detecção de doenças deve ser viável no período pré-sintomático; b) a doença deve ser tratável; e c) deve haver a possibilidade de iniciar o tratamento nos estágios iniciais da doença [8]. Nas duas últimas décadas, a introdução da espectrometria de massa em tandem (MS / MS) expandiu substancialmente o número de distúrbios que podem ser detectados em amostras de sangue seco em papel de filtro. A espectrometria de massa



permite a rápida detecção e quantificação de uma ampla gama de metabólitos por meio da identificação de características de íons (razões de massa por carga) e comparação com padrões internos. Essa técnica substituiu a maioria das triagens de metabólitos individuais e é usada em programas de referência em triagem neonatal para detecção simultânea de mais de 30 doenças, incluindo acidemias orgânicas e distúrbios do metabolismo de ácidos graxos [9]. Atualmente, o hipotireoidismo congênito (HC) é a doença mais amplamente rastreada em programas de triagem neonatal em todo o mundo [10].

## 1.2. Triagem neonatal no Brasil

No Brasil, a triagem neonatal teve início em 1976, quando o Prof. Benjamin Schmidt criou o projeto pioneiro de triagem neonatal para fenilcetonúria na Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de São Paulo (APAE-SP). Foi somente em 2001 que o Ministério da Saúde do Brasil implementou o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), através do Regulamento nº 822 de 06 de junho de 2001. Este regulamento estabeleceu uma série de testes para rastreamento precoce de doenças, confirmação diagnóstica e tratamento, acompanhamento e registro de banco de dados, com uma cobertura pretendida de 100% de nascidos vivos. A disponibilidade de exames foi definida para cada estado brasileiro com base na cobertura e infraestrutura preexistente dos serviços de saúde. O programa foi dividido em três fases de triagem, como segue: Fase I - fenilcetonúria e HC; Fase II - fenilcetonúria, HC e hemoglobinopatias; e Fase III - fenilcetonúria, HC, hemoglobinopatias e fibrose cística [11].

Posteriormente, o Regulamento nº 2.829, de 14 de dezembro de 2012, incluiu a triagem neonatal para hiperplasia adrenal congênita e deficiência de biotinidase no âmbito do programa, englobando todos os estados em uma única categoria [12]. Atualmente, existem 30 centros de referência para triagem neonatal (Serviço de referência em Triagem Neonatal - SRTN) nas 27 unidades federativas brasileiras, que atendem 17.854 postos de coleta. A triagem ampliada, que

permite a detecção de até 30 doenças, é fornecida pelo sistema público de saúde apenas no Distrito Federal e está disponível como programa piloto no estado de Minas Gerais.


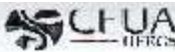
A triagem neonatal no estado do Rio Grande do Sul (RS) começou no final dos anos 80 como iniciativas isoladas em laboratórios de hospitais públicos. Foi somente em 1994 que o governo estadual passou a oferecer exames de triagem em parceria com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e Escola de Farmácia da UFRGS. Atualmente, a instituição de referência para triagem neonatal no estado do RS é o Hospital Materno Infantil Presidente Vargas, onde a unidade de SRTN-RS atua. Como a maioria dos centros em outros estados, este SRTN é equipado com seu próprio laboratório, que realiza mais de 60.000 testes laboratoriais por mês. Em 2015, o SRTN-RS atendeu 1.307 postos de coleta nos 497 municípios que realizam triagem neonatal como serviço público de saúde no estado [13].

## REFERÊNCIAS

1. Guthrie, R. and A. Susi, *A Simple Phenylalanine Method for Detecting Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants*. *Pediatrics*, 1963. 32: p. 338-43.
2. Guthrie, R., *The introduction of newborn screening for phenylketonuria. A personal history*. *Eur J Pediatr*, 1996. 155 Suppl 1: p. S4-5.
3. Guthrie, R., *Blood screening for phenylketonuria*. *Jama*, 1961. 178(8): p. 863-863.
4. Guthrie, R. and A. Susi, *A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants*. *Pediatrics*, 1963. 32(3): p. 338-343.
5. Levy, H.L., P.M. Madigan, and V.E. Shih, *Massachusetts metabolic disorders screening program. I. Technics and results of urine screening*. *Pediatrics*, 1972. 49(6): p. 825-36.
6. Paul, D.B. and J.P. Brosco, *The PKU Paradox: A Short History of a Genetic Disease*. 2013: Johns Hopkins University Press.

7. Gonzalez, J. and M.S. Willis, *Robert Guthrie, MD, PhD Clinical Chemistry/Microbiology*. *Laboratory Medicine*, 2009. 40(12): p. 748-749.
8. Especializada, B.D.d.A., *Manual de normas técnicas e rotinas operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal*. 2005: Editora MS.
9. American College of Medical Genetics/American Society of Human Genetics, T. and G. Technology Transfer Committee Working, *Tandem mass spectrometry in newborn screening. American College of Medical Genetics/American Society of Human Genetics Test and Technology Transfer Committee Working Group*. *Genet Med*, 2000. 2(4): p. 267-9.
10. Therrell, B.L., et al., *Current status of newborn screening worldwide: 2015*. *Semin Perinatol*, 2015. 39(3): p. 171-87.
11. de Carvalho, T.M., et al., *Newborn screening: a national public health programme in Brazil*. *J Inherit Metab Dis*, 2007. 30(4): p. 615.
12. Saúde, M.d., *Portaria n. 2.829, de dezembro de 2012. Inclui a Fase IV no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), instituído pela Portaria n° 822/GM/MS, de 6 de junho de 2001*. 2012, Diário Oficial da União: Brazil.
13. Tonon, T., et al., *Assessment of newborn screening in the public health system of a municipality in northern Rio Grande do Sul*. 2018, 2018. 38(2).

## ANEXO I – Parecer da Comissão de Ética na Utilização de Animais

	<b>UFRGS</b> UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	<b>PRO-REITORIA DE PESQUISA</b> Comissão De Ética No Uso De Animais	
---	--	--	---

**CARTA DE APROVAÇÃO**

**Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:**

**Número:** 29388  
**Título:** METABOLISMO ENERGÉTICO E MORTE CELULAR EM ESTRUTURAS CEREBRAIS DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS A MODELO DE HIPERFENILALANINEMIA

**Vigência:** 01/07/2015 à 28/02/2019


**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

CLOVIS MILTON DUVAL WANNMACHER - coordenador desde 01/07/2015  
ROBERTA VIÉGAS DA SILVA - Técnico de Laboratório desde 01/07/2015  
Itiane Diehl de Francaschi - Aluno de Doutorado desde 01/07/2015  
Vanessa Trindade Bortoluzzi - Aluno de Doutorado desde 01/07/2015

*Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 10/08/2015 - Sala 323 - Anexo I do Prédio da Reitoria- Campus Centro da UFRGS- Bairro Farroupilha - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 232 Ratos Wistar, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.*

Porto Alegre, Segunda-Feira, 16 de Novembro de 2015

  
\_\_\_\_\_  
BRUNO CASSEL NETO  
Vice Pró-Reitor de Pesquisa

1

## **ANEXO II – Considerações Éticas e Tratamento dos Resíduos Biológicos e Químicos**

Os resíduos biológicos gerados pelos experimentos, incluindo luvas, ependorffs, ponteiros, papel higiênico com sangue dos animais, foram descartados em sacos de lixo branco e posteriormente depositados em recipientes próprios localizados no Departamento de Bioquímica (UFRGS). As agulhas e lâminas de bisturi foram descartadas em caixas amarelas (Descarpack®) e as carcaças de animais são colocadas em sacos brancos e armazenadas em freezer próprio no departamento até serem recolhidos. Esses resíduos são periodicamente recolhidos por uma empresa especializada e terceirizada (contratada pela universidade através de licitações), que realiza o descarte do material de acordo com as normas vigentes de biossegurança. Já os resíduos químicos foram armazenados em bombonas plásticas, devidamente identificadas e separados de acordo com a seguinte classificação estabelecida pelo departamento: resíduos orgânicos halogenados, orgânicos não-halogenados, solventes aquosos, solventes orgânicos passíveis de purificação e resíduos sólidos. As embalagens contendo estes resíduos são periodicamente coletadas e enviadas para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos do Instituto de Química da UFRGS.

## ANEXO III – Resposta da Primeira Submissão do Artigo *Oxidative Stress in Phenylketonuria*

23/10/2019

Gmail - Your manuscript, MGM\_2019\_553, has not been accepted



Vanessa Bortoluzzi <vbortoluzzi@gmail.com>

### Your manuscript, MGM\_2019\_553, has not been accepted

2 messages

Ed McCabe (Molecular Genetics and Metabolism) <Evisesupport@elsevier.com>  
Reply-To: Imccabe@mednet.ucla.edu  
To: vbortoluzzi@gmail.com

Tue, Oct 15, 2019 at 11:24 AM

Ref: MGM\_2019\_553  
Title: Oxidative Stress in Phenylketonuria  
Journal: Molecular Genetics and Metabolism

Dear Dr. Bortoluzzi,

Thank you for submitting your manuscript to Molecular Genetics and Metabolism. I regret to inform you that reviewers have advised against publishing your manuscript, and we must therefore reject it.

Please refer to the comments listed at the end of this letter for details of why I reached this decision.

We appreciate your submitting your manuscript to this journal and for giving us the opportunity to consider your work.

Kind regards,

Ed McCabe MD/PhD  
Editor-in-Chief  
Molecular Genetics and Metabolism

Comments from the reviewers:  
-Reviewer 1

-

This review article summarizes the current knowledge on the effect of oxidative stress on the pathogenesis of PKU. Literature is up to date and different aspects of the relationship between ROS and metabolic pathways in PKU are well covered.

What I miss, and the readers would probably also miss, is an illustrative presentation on: 1) how ROS are generated, 2) how ROS interact within metabolic pathways, and 3) how are ROS damaging brain in PKU patients.

Thus, 2-3 Figures would help to understand the background and pathology of ROS in PKU. I would also like to suggest including at least one well-structured Table, listing different sources of ROS and systems involved.

-Reviewer 2

-

The pages should be numbered.

The protocol for the references in this journal is to list ALL the authors (no "et al's").

The authors should have the text edited in their center by someone fluent in English. e.g. page 1 - Abstract - "the typical clinical finds". Introduction - "remarkably the development of the brain". Page 3 - "may account as a consequence of oxidative stress". Page 6 - "animals models".

Authors seem to use "phe" and "HPA" interchangeably.

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

<https://mail.google.com/mail/u/0?ik=44fd8f1d43&view-pt&search=all&permthid=thread-f%3A1647469648900761368&siml=msg-f%3A16474696...> 1/2