

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Departamento de Bioquímica

Modelo de hiperfenilalaninemia induz excitotoxicidade glutamatérgica e alterações  
gliais em ratos: um estudo utilizando o exercício físico como um possível agente  
neuroprotetor

Marcelo Xavier Cortes

Orientador: Carlos Severo Dutra Filho

Porto Alegre

2015

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Departamento de Bioquímica

Modelo de hiperfenilalaninemia induz excitotoxicidade glutamatérgica e alterações  
gliais em ratos: um estudo utilizando o exercício físico como um possível agente  
neuroprotetor

Marcelo Xavier Cortes

Orientador: Carlos Severo Dutra Filho

Dissertação apresentada ao curso de Pós-  
Graduação em Ciências Biológicas –  
Bioquímica da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2015

### CIP - Catalogação na Publicação

Cortes, Marcelo Xavier  
Modelo de hiperfenilalaninemia induz  
excitotoxicidade glutamatérgica e alterações gliais  
em ratos: um estudo utilizando o exercício físico como  
um possível agente neuroprotetor / Marcelo Xavier  
Cortes. -- 18/12/2015.  
68 f.

Orientador: Carlos Severo Dutra Filho.

Dissertação (Mestrado) -- 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,  
18/12/2015.

1. hiperfenilalaninemia. 2. fenilcetonúria. 3.  
astrócitos. 4. glutamato. 5. exercício. I. Dutra  
Filho, Carlos Severo, orient. II. Título.

## Agradecimentos

Primeiramente deixo meu agradecimento póstumo ao grande professor e mentor Marcos Perry, o qual me deu a possibilidade de ingressar no Departamento de Bioquímica da UFRGS, ao lembrar de mim, após dois semestres distantes convidando-me para ser seu monitor da disciplina de Bioquímica Básica na ESEF.

Agradeço à professora Marina que substituiu o professor Perry e que foi minha maior inspiração para seguir meus passos na bioquímica, ingressar no mestrado e concluí-lo.

À Priscila Mazzola, a Pri, que me selecionou como bolsista no laboratório 36 do professor Dutra, atual laboratório 34, a qual apostou no exercício físico como alternativa terapêutica para a fenilcetonúria e sempre buscou na pesquisa científica resultados que trouxessem primeiramente benefícios às pessoas que necessitam da ciência para melhorarem sua qualidade de vida.

Agradeço ao professor Dutra, por aceitar ser meu orientador no mestrado, sempre disposto quando solicitado, tornando todas as dificuldades mais simples, principalmente quando necessitei me distanciar do Departamento por motivos de trabalho.

Agradeço ao pessoal do Lab34, especialmente ao Carlos Jacques, que foi um grande colaborador para que este trabalho acontecesse.

Agradeço ao professor Carlos Alberto (CA) pela orientação, além de sua grande amizade, igualmente à Patrícia Sesterheim, também muito responsável e exemplar no cuidado com os animais do Biotério do Departamento.

À amiga e colaboradora que ingressou comigo no mestrado em Bioquímica, Fabiana Galland, a Fafá, atualmente doutoranda do laboratório 31 da Marina.

Aos colaboradores do laboratório 31: Maria Cristina, Fernanda, Carol e Gabriel. Sem eles este trabalho provavelmente não teria sido concluído.

Aos funcionários do Departamento, principalmente à sempre prestativa Cléia.

Agradeço aos meus amados pais e meu inteligentíssimo irmão que sempre me incentivaram a conclusão deste mestrado.

Agradeço ao meu chefe, mentor e grande amigo Régis, o qual sempre me “cobrou” a conclusão do mestrado buscando sempre meu crescimento profissional e pessoal.

E novamente à Marina que, além de ser minha maior inspiração para seguir meus passos na bioquímica, sempre será minha maior inspiração para viver o resto de minha vida.

## Índice

Resumo .....	1
Abstract.....	2
Lista de Abreviaturas.....	3
<b>1. Introdução.....</b>	<b>4</b>
1.1. Fenilcetonúria .....	4
1.2. Astrócitos .....	7
1.2.1. Sistema Glutamatérgico.....	8
1.2.2. Proteínas Marcadoras de astrócitos - S100B e GFAP.....	10
1.2.2.1. S100B.....	10
1.2.2.2. GFAP .....	11
1.3. Exercício Físico – efeitos no SNC.....	12
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>15</b>
<b>3. Metodologia.....</b>	<b>16</b>
3.1. Animais.....	16
3.2. Desenho Experimental .....	16
3.3. Protocolo de Exercício Físico .....	17
3.4. Indução Química de HPA .....	17
3.5. Obtenção das Amostras Biológicas .....	18
3.6. Captação de Glutamato .....	18
3.7. Atividade da glutamina sintetase (GS) .....	19
3.8. Conteúdo de glutathione reduzida .....	19
3.9. S100B.....	20
3.10. GFAP.....	21
3.11. Medida da concentração de aminoácidos.....	22
3.12. Medida da concentração de proteínas .....	22
3.13. Análise Estatística .....	22
<b>4. Resultados .....</b>	<b>23</b>
4.1. Efeito do modelo de HPA e do exercício físico sobre as concentrações de Phe no soro e de glutamato no LCR de ratos.....	23
4.2. Efeito do modelo de HPA e do exercício físico sobre a captação de glutamato em córtex cerebral e hipocampo de ratos.....	24

4.3. Efeito do modelo de HPA e do exercício físico sobre a atividade da GS e o conteúdo de GSH em córtex cerebral e hipocampo de ratos .....	26
4.4. Efeito do modelo de HPA e do exercício físico sobre a concentração de GFAP e S100B em córtex cerebral e hipocampo de ratos .....	28
4.5. Efeito do modelo de HPA e do exercício físico sobre a concentração de S100B no LCR e soro de ratos .....	30
<b>5. Discussão .....</b>	<b>32</b>
5.1. O modelo de HPA induziu excitotoxicidade glutamatérgica em ratos, o que não ocorreu nos animais submetidos a treinamento físico. ....	32
5.2. O modelo de HPA induziu alterações na S100B cerebral, que foram parcialmente evitadas quando os animais foram submetidos a treinamento físico, sem alterar a concentração de GFAP. ....	35
5.3. O treinamento físico é capaz de modular a atividade astrocitária em animais saudáveis. ....	40
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>43</b>
<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>44</b>

## Resumo

A fenilcetonúria é um dos mais comuns erros inatos do metabolismo, caracterizada por uma deficiência ou uma menor atividade da enzima fenilalanina hidroxilase, responsável pela hidroxilação irreversível da fenilalanina em tirosina. Essa deficiência enzimática leva a um quadro de hiperfenilalanina, característico desta doença, ocasionando o acúmulo de fenilalanina em diferentes tecidos corporais. Quando não diagnosticada precocemente, a criança com fenilcetonúria apresenta um quadro clínico caracterizado por microcefalia, retardo mental grave e epilepsia. Estudos em culturas de células neuronais observaram que a fenilalanina causa alterações na transmissão sináptica glutamatérgica, o que foi relacionado com as alterações cerebrais características de pacientes fenilcetonúricos não tratados. Entretanto, nenhum estudo em modelo *in vivo* foi realizado para elucidar a participação dos astrócitos, o principal tipo celular responsável pela remoção do glutamato da fenda sináptica, nesse processo de toxicidade. Outros fatores observados na doença são um aumento sérico de S100B em pacientes, bem como um aumento de GFAP, observado em cerebelo de camundongos hiperfenilalaninêmicos. O treinamento físico impediu o aumento do estresse oxidativo em modelo animal de hiperfenilalaninemia, além de impedir a diminuição da concentração de triptofano cerebral causada pela indução do modelo. Considerando os efeitos da fenilcetonúria no sistema nervoso central e a falta de estudos sobre o papel dos astrócitos nessa doença, bem como o possível potencial terapêutico do treinamento físico, o objetivo deste estudo foi avaliar as funções astrocitárias, incluindo o metabolismo glutamatérgico e proteínas específicas como a S100B e a GFAP, em um modelo de hiperfenilalaninemia induzido em ratos jovens e a influência do treinamento físico nestes e em animais saudáveis. Foi observada uma diminuição na captação de glutamato com conseqüente aumento na concentração de glutamato no líquido dos animais submetidos ao modelo de hiperfenilalaninemia, sugerindo um quadro de excitotoxicidade. Também foi observada uma redução da concentração de S100B no tecido cerebral e aumento da concentração dessa proteína no líquido. O treinamento físico, realizado em paralelo com a indução do modelo foi capaz de impedir todas essas alterações, exceto pelo aumento de S100B no líquido. Além disso, nos animais controle, o treinamento físico também teve efeitos no sistema nervoso central, aumentando o conteúdo intracelular de S100B e GFAP. Juntos, esses dados sugerem que os astrócitos estão envolvidos na fisiopatologia da fenilcetonúria e que o treinamento físico pode ser uma estratégia terapêutica adjuvante para essa doença, uma vez que, apesar de não ter normalizado a concentração sérica de fenilalanina, foi capaz de exercer um papel protetor no sistema nervoso central. Outro achado relevante foi o efeito do exercício físico no sistema nervoso central dos animais jovens, sugerindo um aumento do trofismo astrocitário, que pode ser de extrema importância para o desenvolvimento cerebral.

**Abstract**

Phenylketonuria is one of the most common inborn errors of metabolism characterized by a deficiency or reduced activity of the enzyme phenylalanine hydroxylase, responsible for irreversible hydroxylation of phenylalanine to tyrosine. This enzyme deficiency leads to hyperphenylalaninemia, characteristic of this pathology, causing an increase in the phenylalanine concentration in different tissues. If not detected early, children with phenylketonuria have a clinical condition characterized by microcephaly, severe mental retardation and epilepsy. Studies in neuronal cell cultures observed that phenylalanine causes changes in glutamatergic synaptic transmission, which has been linked to brain changes characteristics of untreated patients. However, there is a lack of information about the involvement of astrocytes, the primary cell type responsible for the removal of glutamate from the synaptic cleft, in the process of toxicity in animal model. It has been observed an increase in serum S100B in patients, and an increase in GFAP measured in cerebellum of hyperphenylalaninemic mice. The physical training prevented the oxidative stress in an animal model of hyperphenylalaninemia, and the decrease in the concentration of brain tryptophan caused by the induction of the model. Considering the effects of phenylketonuria in the central nervous system and the lack of studies on the role of astrocytes in this pathology as well as the possible therapeutic potential of physical training, the objective of this study was to evaluate the astrocytic functions, including glutamatergic metabolism and specific proteins as S100B and GFAP, in a hyperphenylalaninemic model induced in young rats and the influence of exercise training in hyperphenylalaninemic and healthy animals. We observed a decreased glutamate uptake with a consequent increase in glutamate concentration in cerebrospinal fluid in animals subjected to hyperphenylalaninemic model, suggesting a excitotoxicity mechanism. Besides, hyperphenylalaninemic rats showed a reduction of S100B concentration in brain tissue and an increase in the concentration of this protein in cerebrospinal fluid. Physical training, held in parallel with the induction of the model was able to prevent all these changes, except for the increased S100B in cerebrospinal fluid. Moreover, in control animals, physical training also had effects on the central nervous system, increasing the intracellular content of S100B and GFAP. Together, these data suggest that astrocytes are involved in the pathophysiology of phenylketonuria and exercise training may be considered a complementary therapeutic strategy since it was able to exert a protective role in the central nervous system, even than it was not able to normalize serum phenylalanine concentration. Another important finding was the effect of exercise on central nervous system of young animals, suggesting an increase in astrocytic tropism, which can be extremely important for brain development.

**Lista de Abreviaturas**

PKU – Fenilcetonúria

PAH – Fenilalanina Hidroxilase

SNC – Sistema Nervoso Central

HPA – Hiperfenilalaninemia

BH4 – Tetrahydrobiopterina

GS – Glutamina Sintetase

GFAP – Proteína Glial Fibrilar Ácida

GSH – Glutathiona Reduzida

## 1. Introdução

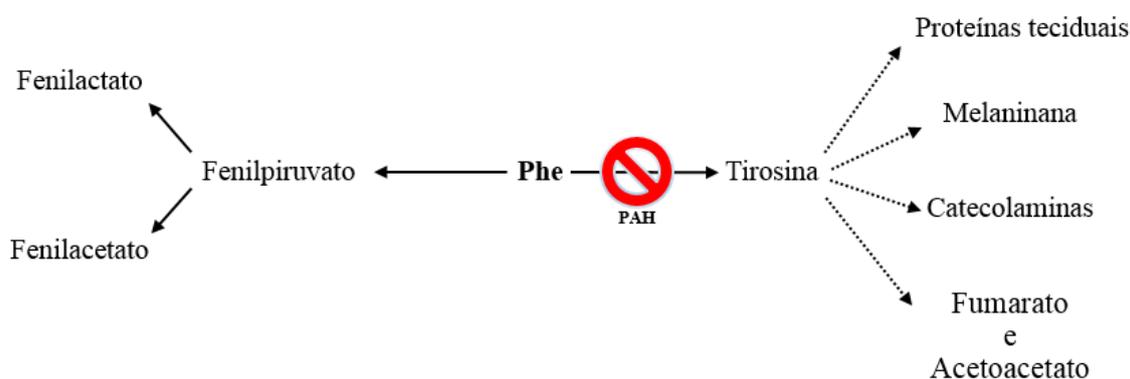
### 1.1. Fenilcetonúria

A fenilcetonúria (PKU) é um dos mais comuns erros inatos do metabolismo, sendo registrada na frequência de 1 para cada 10.000 a 15.000 nascimentos (Widaman, 2009). Foi descrita pela primeira vez em 1934 pelo médico norueguês Asbjorn Fölling, a partir da observação de dois irmãos com retardo mental, que apresentavam odor característico na urina e excreção aumentada de ácido fenilpirúvico e fenilalanina (Phe) (Christ, 2003). Os níveis elevados de Phe encontrados em pacientes fenilcetonúricos podem ser verificados em uma análise quantitativa de seus aminoácidos plasmáticos. Um indivíduo com esta doença apresenta concentrações de Phe plasmática superiores a 120  $\mu\text{mol/L}$  (2 mg/dL) em um estado não tratado (Guttler, 1980).

Este erro inato do metabolismo descrito por Asbjorn Fölling é provocado por herança genética de um erro no cromossomo 12 (Kohli et al., 2005), onde está localizado o gene da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH). Esta enzima predominantemente presente no fígado – além de ser encontrada nos rins e no pâncreas – é responsável pela catálise da hidroxilação irreversível da Phe, um aminoácido essencial, convertendo-a em tirosina usando tetrahydrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ) como cofator. A mutação desta enzima na população fenilcetonúrica é responsável por aproximadamente 98% dos casos de hiperfenilalaninemias, onde poucos casos são resultantes de deficiências na disponibilidade de  $\text{BH}_4$  (Blau et al., 2010; Harding, 2010). Uma vez que a PKU é caracterizada por uma deficiência ou uma menor ativação da enzima PAH, além do acúmulo de Phe encontrado em diferentes tecidos corporais, observa-se uma deficiência de tirosina e seus derivados (Fernstrom and Fernstrom, 2007). Quando não diagnosticada precocemente, a criança com PKU apresenta um quadro clínico caracterizado por microcefalia, retardo mental severo e epilepsia (Surtees and Blau, 2000), além de baixa

pigmentação cutânea, atraso no crescimento e eczema (Harding, 2010). Mais tarde, entre os 20 e 30 anos de idade, ocorre o surgimento ou a progressão da desordem motora (Surtees and Blau, 2000).

A fim de evitar esses distúrbios, as pessoas que apresentam este erro inato do metabolismo adotam uma dieta hipoproteica, especialmente restrita em Phe, para a manutenção dos níveis sanguíneos deste aminoácido mais próximos da normalidade, evitando os quadros de hiperfenilalaninemia (HPA) característicos desta doença (Zhou et al., 2015). Entretanto, a necessidade proteica nutricional e o fato da Phe ser um aminoácido essencial, não permite sua total eliminação da dieta, causando oscilações plasmáticas de sua concentração. Na carência da enzima PAH hepática, a Phe ingerida não metabolizada segue rotas alternativas, formando, principalmente, os metabólitos fenilpiruvato, fenilactato e fenilacetato (Figura 1). Sabe-se que, mesmo para indivíduos submetidos precocemente e continuamente à dieta especial, um aumento agudo de Phe sanguínea e de seus metabólitos é tóxico ao organismo, mas ainda não se sabe se as desordens acarretadas são devidas a Phe ou aos seus metabólitos. (Guttler and Lou, 1986; Surtees and Blau, 2000; Taylor et al., 1983).



**Figura 1: Metabolismo da Phe**

Considerando que a Phe utiliza o mesmo transportador que os demais aminoácidos neutros, as elevadas concentrações de Phe sanguínea provocam uma redução da captação dos outros aminoácidos neutros, entre eles a tirosina, pelas glândulas supra-renais (Schulpis et al., 2005), bem como pela barreira hematoencefálica. (Herrero et al., 1983; Milovanovic et al., 1999; Surtees and Blau, 2000). Sendo assim, esses pacientes acabam por sofrer uma menor disponibilidade de tirosina nesses tecidos, podendo alterar a síntese tanto de catecolaminas como de neurotransmissores, uma vez que a tirosina é precursora de dopamina (Fernstrom and Fernstrom, 2007; Schulpis et al., 2005).

Outra característica importante da PKU é que os pacientes apresentam alterações no balanço oxidativo. O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio e a capacidade do organismo em detoxificar ou reparar os danos resultantes de sua formação. Estudos indicam que é o quadro de HPA que provoca o estresse oxidativo no sistema nervoso central (SNC) de animais (Moraes et al., 2014), bem como em pacientes fenilcetonúricos, observado pelo aumento de marcadores em sangue e urina (Sanayama et al., 2011).

Além de estar presente na PKU, o estresse oxidativo também está associado a doenças neurodegenerativas como Alzheimer (Forestier et al., 2015) e Parkinson (Blesa et al., 2015). Experimentos em roedores, já mostraram tanto *in vitro* como *in vivo* que elevados níveis de Phe no SNC provocam o aumento de estresse oxidativo, seja por aumento de lipoperoxidação como por redução de suas defesas antioxidantes (Kienzle Hagen et al., 2002). Devido ao alto consumo de oxigênio, seus elevados níveis de ferro, sua composição rica em lipídios insaturados e baixos níveis de defesas antioxidantes o SNC caracteriza-se como um tecido suscetível a estresse oxidativo (Gutteridge and Halliwell, 1992; Halliwell and Gutteridge, 1986).

## 1.2. Astrócitos

No final do século XIX a neuroglia foi reconhecida como elementos celulares que davam suporte às células do SNC, sendo subdividida em astrócitos, oligodendrócitos e mais recentemente em células NG2 (Wang and Bordey, 2008).

Os astrócitos auxiliam a manter a viabilidade e atividade neuronal, além de serem responsáveis pela manutenção dos níveis extracelulares de potássio (Cheung et al., 2015), de neurotransmissores (Schober and Mongin, 2015) e de nutrientes (Leloup et al., 2015). Também são importantes pelo suporte estrutural e metabólico às sinapses (Hahn et al., 2015), bem como na formação e manutenção da barreira hematoencefálica (Thomsen et al., 2015). Outro papel fundamental desse tipo celular está na manutenção do ambiente redox cerebral, uma vez que atua na síntese e exportação da glutatona, uma defesa antioxidante cerebral essencial (Dringen et al., 2014). Além disso, os astrócitos são importantes na detoxificação de neurotransmissores, bem como nos processos de sinaptogênese, angiogênese e na manutenção da barreira hematoencefálica (Schummers et al., 2008).

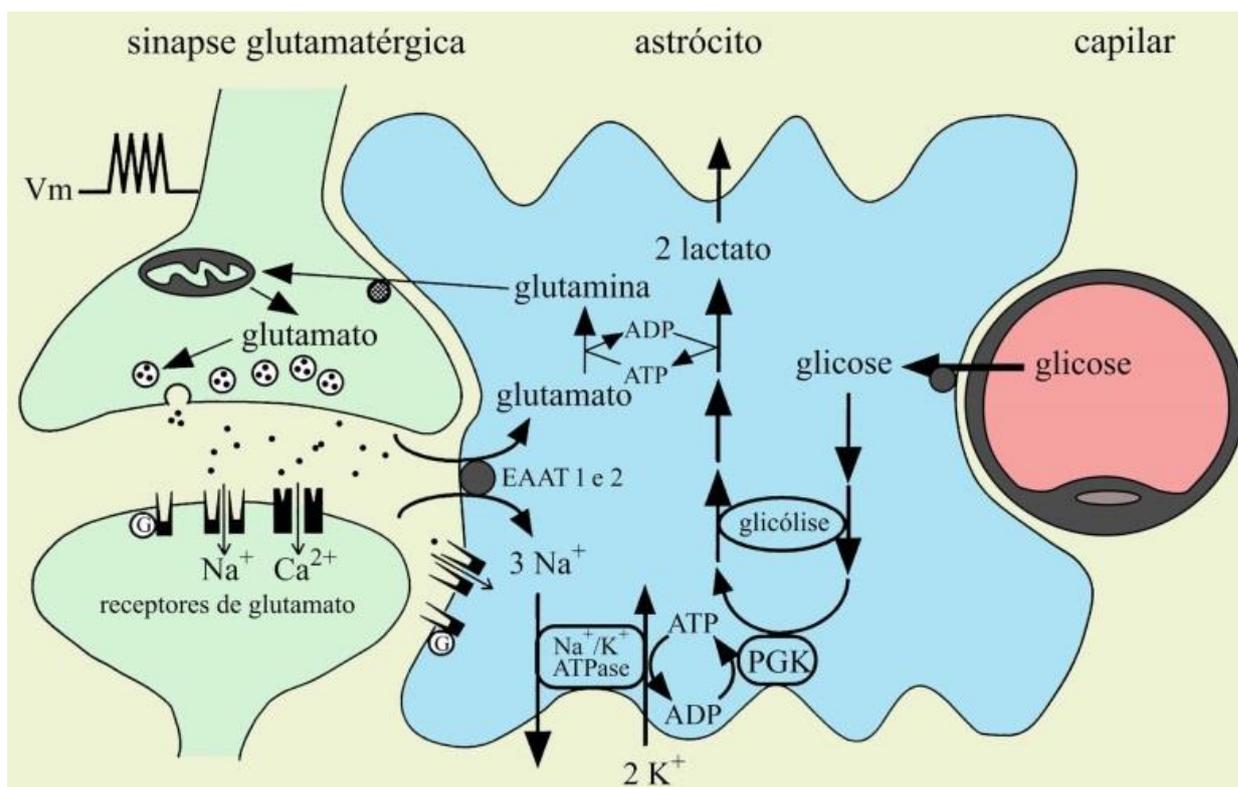
Funcionalmente os astrócitos são definidos como células incapazes de gerar potenciais de ação ou mielinizar axônios, mas detoxificam o meio extracelular e fornecem os substratos necessários ao funcionamento neuronal (Cheung et al., 2015). Estudos recentes demonstram que os astrócitos podem contribuir ativamente para a plasticidade sináptica e sua atividade através da liberação de neurotransmissores e ação sobre o fluxo sanguíneo, mostrando que os astrócitos são muito mais que elementos passivos que mantêm a estrutura do espaço extracelular, possuindo eficientes mecanismos para desenvolver suas importantes funções. Um fator positivo é seu contato com os vasos

sanguíneos o que favorece a esta célula captação de glicose e outros nutrientes (Broux et al., 2015).

### 1.2.1. Sistema Glutamatérgico

Uma essencial função dos astrócitos é de proteger os neurônios contra excitotoxicidade glutamatérgica, através da captação de glutamato do meio extracelular (Magistretti and Pellerin, 1999). A captação de glutamato é ativada com o aumento da atividade sináptica glutamatérgica. O neurônio pré-sináptico libera glutamato o qual é captado pelos transportadores astrocitários GLAST e GLT-1. Isto permite que transmissão sináptica siga ocorrendo normalmente e impede que ocorra a morte dos neurônios por excesso de estimulação glutamatérgica, fenômeno chamado de excitotoxicidade (Choi, 1987; Hanson et al., 2015; Olney, 1982).

O glutamato captado pelos astrócitos é metabolizado a glutamina através da ação da enzima glutamina sintetase (GS) (Boksha et al., 2000; Yamamoto et al., 1987). A glutamina é então transportada ao meio extracelular a qual é captada pelos neurônios e servirá como substrato para nova síntese de glutamato permitindo a manutenção do ciclo glutamato-glutamina (Figura 2) (Caldani et al., 1982; Magistretti and Pellerin, 1999; Pellerin and Magistretti, 1994).



**Figura 2: ciclo glutamato-glutamina.** Adaptado de Magistretti e Pellerin, 1999 (Magistretti and Pellerin, 1999)

Originalmente acreditava-se que os astrócitos apenas captavam glicose do sangue e a disponibilizavam para os neurônios. Porém, verificou-se que os astrócitos realizam principalmente glicólise anaeróbica. Sendo assim, sua geração de energia (ATP) leva à produção de piruvato o qual vai a lactato. Este lactato é liberado no meio extracelular de onde é captado pelos neurônios. Estes neurônios, por sua vez, expressam a enzima lactato desidrogenase 1, que catalisa preferencialmente a síntese de piruvato a partir do lactato captado, o qual será utilizado para metabolismo oxidativo, gerando energia para suprir o aumento da atividade sináptica neuronal (Leloup et al., 2015; Pellerin and Magistretti, 2012).

Em relação à PKU, já foi observado que uma maior captação de Phe pelo SNC provoca alterações no sistema glutamatérgico. Em cultura de neurônios de camundongos

transgênicos *Pah*<sup>enu2</sup>, com HPA, observou-se anormal transmissão sináptica glutamatérgica indo ao encontro das diversas alterações cerebrais características de pacientes fenilcetonúricos não tratados que podem levar a convulsões, retardo mental e anormalidades morfológicas (Martynyuk et al., 2005).

### 1.2.2. Proteínas Marcadoras de astrócitos - S100B e GFAP

#### 1.2.2.1. S100B

A proteína S100B é principalmente produzida e secretada por astrócitos no SNC, podendo ter ação trófica ou tóxica, dependendo de sua concentração (Van Eldik and Wainwright, 2003). Essa proteína é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e, quando em altas concentrações no soro de pacientes, é considerada marcadora de dano cerebral (Barateiro et al., 2015; Chiang et al., 2015; Manzano et al., 2015; Purucker et al., 2014). Em doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, é observado um aumento sérico de S100B, que pode estar relacionado com um aumento nas citocinas inflamatórias (Sathe et al., 2012). No entanto, tecidos periféricos podem secretar essa proteína, como o tecido adiposo (Netto et al., 2006; Scaccianoce et al., 2004) e o muscular esquelético (Beccafico et al., 2011; Schulpis et al., 2007), havendo a possibilidade de também contribuírem na concentração sérica (Hasselblatt et al., 2004).

Já foi observado, em pacientes fenilcetonúricos com quadro de HPA, um aumento sérico significativo de S100B. Tendo conhecimento sobre as diversas alterações no SNC causadas por essa doença, este aumento pode estar relacionado ao tecido cerebral (Schulpis et al., 2004). Entretanto, até o presente momento não existem estudos relacionando a PKU e a concentração de S100B no líquido cefalorraquidiano (LCR), o que poderia refletir a concentração de S100B no SNC sem a influência de tecidos periféricos.

#### 1.2.2.2. GFAP

A proteína glial fibrilar ácida (GFAP) é uma proteína de filamentos intermediários, considerada marcadora de astrócitos maduros, sendo responsável, entre outras funções, por modular a morfologia dessas células e a emissão de processos (Eng et al., 2000). Apesar disso, a GFAP já foi encontrada em oligodendrócitos e glia entérica (Middeldorp and Hol, 2011). A GFAP possui um importante papel na regeneração tecidual, onde o seu aumento após uma lesão está envolvido na formação da cicatriz glial (Eng et al., 2000; Pekny and Pekna, 2004). No entanto, essa proteína também pode estar envolvida em mecanismos tóxicos, como na gliose reativa, situação na qual os astrócitos ficam ativados e secretam mais citocinas pró-inflamatórias, e envolvida na patofisiologia de diferentes distúrbios do SNC (Jain et al., 2015). Dessa forma, podemos dizer que a GFAP possui um papel duplo no SNC, sendo importante na reparação de um dano, ou tendo um papel na progressão de algumas doenças (Pekny et al., 2014).

Já foi demonstrado que a ativação das células da glia, em resposta a estímulo lesivo, provoca alterações em níveis de GFAP, S100B e defesas antioxidantes (Eng et al., 2000; Vicente et al., 2004). Como a GFAP é considerada um marcador específico de astrócitos e, atualmente, seu aumento é dado como sinalizador de astrogliose, associando-a a condições de lesão cerebral (Rodrigues et al., 2010), ela poderia ser relacionada à PKU, devido às suas características neurodegenerativas, além de poder estar associada com o aumento de estresse oxidativo em SNC, já demonstrado nesta doença.

Existem poucas evidências na literatura do envolvimento da proteína GFAP na PKU. Em um modelo de camundongos transgênicos para PKU já foi observado uma mudança na expressão de GFAP em oligodendrócitos, aumentando a sua expressão e passando para um fenótipo não mielinizante, o que poderia contribuir para as características observadas

na doença (Dyer et al., 1996). Com relação ao conteúdo de GFAP em astrócitos, já foi mostrado que seus níveis não são alterados no telencéfalo de ratos submetidos a um modelo de HPA, por outro lado, as concentrações de GFAP se mostraram aumentadas no cerebelo desses animais a partir dos 28 dias (Ushakova et al., 1997). Até o presente momento, não existem dados na literatura a respeito da concentração de GFAP no hipocampo e córtex cerebral de ratos submetidos a um modelo de HPA ou em animais transgênicos para PKU.

### 1.3. Exercício Físico – efeitos no SNC

O exercício físico é considerado uma estratégia terapêutica com vários benefícios já documentados em diversas doenças, entre elas as doenças neurodegenerativas (Bernardes et al., 2015; Herbst and Holloway, 2015; Ji et al., 2015; Paillard, 2015; Paillard et al., 2015). Inicialmente, o exercício provoca um aumento na demanda energética corporal, o que leva ao aumento do estresse oxidativo em diversos tecidos, incluindo o SNC. Entretanto, o treinamento físico provoca uma adaptação do organismo a este estresse, proporcionando assim, o aumento de suas defesas antioxidantes (Aksu et al., 2009; Radak et al., 2007). Pesquisas de nosso grupo mostraram que o treinamento físico, em modelo animal submetido a modelo de HPA, impediu o aumento do estresse oxidativo induzido pelo modelo, inclusive evitando a redução nos níveis de enzimas antioxidantes no SNC, entre elas a glutathiona peroxidase (Mazzola et al., 2011).

Um dos efeitos positivos do treinamento físico no SNC é sua influência sobre a plasticidade cerebral, como a melhora das funções cognitivas (Kashihara et al., 2009; Kramer et al., 2006) e da memória (Alaei et al., 2008; de Senna et al., 2011), mostrando um caráter protetor para diversas doenças neurodegenerativas (Mirochnic et al., 2009; Smith and Zigmond, 2003). O exercício físico é capaz de induzir neurogênese em

modelos animais, através do aumento da plasticidade cerebral propiciado pela prática de atividade física (Kim et al., 2003; van Praag et al., 1999a; van Praag et al., 1999b; van Praag et al., 2005).

Ratos submetidos a um modelo experimental da doença de Alzheimer, após quatro semanas de treinamento físico em esteira, apresentaram melhoras motoras bem como uma menor perda de células de Purkinje cerebelares, quando comparados a roedores que não foram submetidos a treinamento (Lee et al., 2014). Levando em consideração que pacientes fenilcetonúricos não tratados, a longo prazo, apresentam uma prejudicada coordenação motora (Surtees and Blau, 2000), bem como um déficit cognitivo (Soloway et al., 2013), o exercício poderia ter um papel benéfico nesta população.

Apesar dos poucos estudos existentes relacionando o exercício físico à atividade astrocitária, já foi relatado que o exercício provoca o aumento da expressão proteica da GFAP assim como das células que a expressam (astrócitos) no córtex cerebral e estriado de ratos (Li et al., 2005). Além disso, o treinamento físico é capaz de aumentar a concentração de GFAP (Saur et al., 2014), bem como de estimular a proliferação de astrócitos no hipocampo de roedores (Uda et al., 2006). O aumento de GFAP e a proliferação de astrócitos induzidos pelo exercício físico observados nesses trabalhos provavelmente não estão relacionados a um mecanismo de gliose reativa, mas sim a um efeito trófico e de aumento de plasticidade cerebral. Por outro lado, em modelos animais da doença de Parkinson, onde um aumento da concentração de GFAP é observado e está relacionada a um quadro de gliose reativa, o treinamento físico impediu o aumento exacerbado dessa proteína no estriado, o que foi associado a um efeito protetor, diminuindo a reatividade glial (Al-Jarrah and Jamous, 2011; Dutra et al., 2012). Quanto ao envolvimento da GFAP na PKU, já foi encontrado um aumento dessa proteína no cerebelo de ratos submetidos a modelo de HPA (Ushakova et al., 1997). Entretanto, ainda

não se tem dados na literatura mostrando se o exercício físico poderia ter algum efeito sobre a concentração de GFAP cerebral nessa população.

Em relação aos neurotransmissores cerebrais que estão alterados nos fenilcetonúricos, estudos de nosso grupo encontraram níveis diminuídos de triptofano, um precursor de serotonina, em cérebro total de ratos hiperfenilalaninêmicos, os quais tiveram a diminuição de triptofano impedida quando os animais foram submetidos a treinamento físico (Mazzola et al., 2012). Como já foi observado que a serotonina (Tramontina et al., 2008) e o glutamato (Goncalves et al., 2002; Tramontina et al., 2006) modulam as concentrações extracelulares de S100B em cultura de astrócitos, pode haver uma maior relação entre alterações nos níveis desses neurotransmissores e as modificações características dessa doença.

O exercício físico, quando realizado agudamente em indivíduos saudáveis, proporciona o aumento sérico de S100B (Hasselblatt et al., 2004). Porém, o treinamento físico proporciona diversas modificações no organismo buscando sua adaptação às perturbações da homeostasia provocadas pelo exercício, tendo papel importante sobre fatores de transcrição (Lindholm and Rundqvist, 2015), aumento de enzimas antioxidantes (Gomez-Cabrera et al., 2008), aumento da biogênese e atividade mitocondrial (Drake et al., 2015), melhora na perfusão cardiovascular e cerebral (Tarumi and Zhang, 2015), entre diversos outros já documentados. Estudos anteriores mostraram um efeito benéfico do treinamento físico em modelos de demência, inclusive com normalização da concentração de S100B no LCR (Rodrigues et al., 2010). Além disso, não se conhece o efeito do exercício físico crônico sobre a concentração sérica de S100B e dos seus possíveis efeitos sobre os fenilcetonúricos.

## 2. Objetivos

- Avaliar as funções astrocitárias, incluindo o metabolismo glutamatérgico e proteínas específicas como a S100B e a GFAP, em um modelo de HPA induzido em ratos Wistar jovens.
- Avaliar o efeito do treinamento físico crônico sobre as funções astrocitárias em um modelo de HPA induzido em ratos Wistar jovens.
- Avaliar efeito do treinamento físico crônico sobre as funções astrocitárias em ratos Wistar jovens.

### 3. Metodologia

#### 3.1. Animais

Os ratos Wistar foram obtidos do biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Foram utilizadas 7 ratas prenhas que permaneceram junto com suas ninhadas até o desmame. Ao nascimento, os 43 filhotes foram separados aleatoriamente entre os quatro grupos experimentais. Desde o nascimento até o final do experimento, os animais foram mantidos em ciclo de 12 h claro/12 h escuro, à temperatura constante de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  com acesso a alimento e água *ad libitum*. As fêmeas foram alojadas individualmente em caixas de propileno (41 x 34 x 16 cm), que foram limpas e a maravalha foi trocada 3 vezes por semana. Ao nascimento dos filhotes, as fêmeas foram mantidas junto com a sua ninhada até o desmame (21 dias pós-natal). Após o desmame, as ratas foram mortas por decapitação e os animais foram mantidos nas mesmas condições descritas anteriormente até o final do experimento.

O projeto de pesquisa foi cadastrado com o número 21978 e aprovado pelas Comissões de Pesquisa de Ética no Uso de Amimais da UFRGS.

#### 3.2. Desenho Experimental

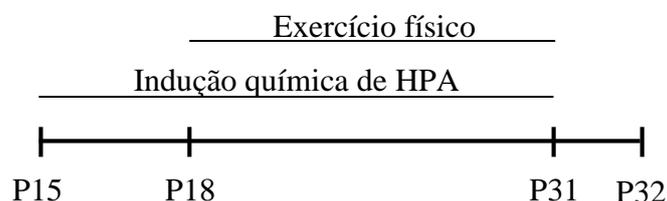
Os animais foram divididos em quatro grupos, sendo:

SedSAL – grupo sedentário e que recebeu injeções de salina

SedHPA – grupo sedentário e submetido ao modelo de HPA

ExeSAL – grupo submetido ao exercício físico e que recebeu injeções de salina

ExeHPA – grupo submetido ao exercício físico e ao modelo de HPA



### 3.3. Protocolo de Exercício Físico

A partir dos 15 dias de vida, os animais dos grupos ExeSAL e ExeHPA foram habituados à esteira motorizada adaptada a roedores (INBRAMED TK 01, Porto Alegre, Brasil) para minimizar o estresse ao aparato, ao local e ao tipo exercício que seriam expostos, durante 3 dias. A partir do quarto dia, com 18 dias de vida, os animais dos grupos ExeSAL e ExeHPA foram submetidos ao protocolo de exercício de 20 minutos de corrida por dia durante 14 dias consecutivos (P18-P31), entre às 17 e 18 horas (Mazzola et al., 2011) em intensidade aeróbica na velocidade de 12 metros por minuto (Meeusen et al., 1996). Durante todas sessões de treinamento, os grupos não exercitados (SedSAL e SedHPA) foram mantidos nas suas gaiolas enquanto os demais corriam.

### 3.4. Indução Química de HPA

A HPA foi induzida nos ratos como descrito por Hagen em 2002 (Kienzle Hagen et al., 2002). A partir dos 15 dias de vida os animais dos grupos SedHPA e ExeHPA receberam injeções diárias, pela manhã, subcutâneas de 2,1  $\mu\text{mol}$  de Phe e 1,6  $\mu\text{mol}$  de  $\alpha$ -metilfenilalanina por grama de peso corporal. Após 9 h da injeção, à tarde, uma nova injeção subcutânea de Phe na mesma concentração foi aplicada. As substâncias foram dissolvidas em solução salina (cloreto de sódio a 0,9%) com o uso de aquecimento. Os grupos controle (SedSAL e ExeSAL) receberam o volume equivalente em salina. Esse protocolo foi realizado durante 17 dias, até o trigésimo primeiro dia de vida dos animais, segundo o desenho experimental mostrado anteriormente. Os ratos foram sacrificados 14 horas após a última injeção de Phe e as amostras foram obtidas e armazenadas.

### 3.5. Obtenção das Amostras Biológicas

No trigésimo segundo dia de vida, 14 h após a última injeção subcutânea e a realização da sessão de exercício, os animais foram anestesiados com cetamina (75 mg/kg de peso corporal) e xilazina (10 mg/kg de peso corporal) e posicionados em estereotáxico. O LCR foi coletado lentamente por punção da cisterna magna e o sangue dos animais foi coletado por punção cardíaca. O LCR foi imediatamente congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  e o sangue foi deixado em repouso durante 5 minutos para coagular e em seguida foi centrifugado a 1000 rpm para a separação do soro, que foi imediatamente congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Após à obtenção das amostras de LCR e soro, os animais foram mortos por decapitação e o cérebro foi removido. O córtex cerebral e o hipocampo foram dissecados em uma placa de Petry no gelo e fatiados em Chopper McIlwain na espessura de 300  $\mu\text{m}$ . As fatias foram processadas conforme descrito em cada técnica.

### 3.6. Captação de Glutamato

A captação de glutamato foi medida segundo (Gottfried et al., 2002) com modificações (Thomazi et al., 2004). As fatias de tecido cerebral passaram por um período de estabilização de 20 minutos a temperatura ambiente em solução de *Hank's balanced salt solution* (HBSS), contendo 137 mM de NaCl; 5,36 mM de KCl; 1,26 mM de  $\text{CaCl}_2$ ; 0,41 mM de  $\text{MgSO}_4$ ; 0,49 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,63 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,44 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 4,17 mM de  $\text{NaHCO}_3$  e 5,6 mM de glicose, em pH 7,4. Após a estabilização, as fatias foram incubadas a  $35^{\circ}\text{C}$  em meio HBSS, onde a reação foi iniciada pela adição de 1,5 mM de L-glutamato e 0,33  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$  de L-[2,3- $^3\text{H}$ ] glutamato. Após 5 minutos (para as fatias de hipocampo) ou 7 minutos (para as fatias de córtex cerebral) de incubação com o glutamato radioativo, a reação foi parada pela remoção do meio e lavagem das fatias por 3 vezes com HBSS gelado. As fatias foram lisadas em 0,5 M de

NaOH e a radioatividade foi determinada em um contador de cintilação. A captação independente de sódio foi determinada utilizando uma solução contendo N-metil-D-glucamina ao invés de NaCl a 4°C (placa sobre o gelo).

O resultado da captação de glutamato através de transportadores dependentes de sódio foi obtido subtraindo a captação independente de sódio (considerada inespecífica) do valor de captação total. Os resultados foram expressos em nmol/mg prot/min.

### 3.7. Atividade da glutamina sintetase (GS)

A atividade da GS foi determinada de acordo com (Minet et al., 1997) com pequenas modificações. As fatias de hipocampo foram isoladas e homogeneizadas em 50 mM de tampão imidazol. A seguir, os homogeneizados foram incubados com uma solução contendo 50 mM de imidazol; 50 mM de hidroxilamina; 100 mM de L-glutamina; 25 mM de arsenato de sódio dibásico; 0,2 mM de ADP e 2 mM de cloreto de manganês em pH 6,2. A incubação foi realizada por 15 minutos a 37°C. A seguir, a reação foi parada pela adição de uma solução contendo 0,37 M de FeCl<sub>3</sub>; 200 mM de ácido tricloroacético e 67 mM de HCl.

### 3.8. Conteúdo de glutathiona reduzida

A concentração de glutathiona reduzida (GSH) foi determinada segundo Browne (Browne and Armstrong, 1998). As fatias de córtex cerebral ou hipocampo, assim que isoladas, foram homogeneizadas em tampão fosfato (0,1 M; pH 8,0), contendo 5 mM de EGTA e as proteínas foram precipitadas pela adição de 1,7% de ácido meta-fosfórico. Após centrifugação, o sobrenadante foi separado e adicionado ao *o*-ftaldialdeído (solução 1 mg/mL em metanol). Após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente, a fluorescência foi determinada utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 350 e 420 nm, respectivamente. Uma curva de concentração foi realizada com uma

solução padrão de GSH, variando de 0,1-500  $\mu\text{M}$ . A concentração de GSH foi calculada utilizando a curva padrão e foi expressa em nmol de GSH/mg de proteína total.

### 3.9. S100B

A concentração de S100B foi medida nas amostras de LCR, soro e tecido cerebral (córtex e hipocampo) utilizando dois protocolos distintos, previamente descritos (Leite et al., 2008). As amostras de tecido cerebral foram congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  após isoladas e, na hora da dosagem, foram homogeneizadas em tampão fosfato 0,1 M, contendo PMSF (1 mM) e EGTA (1 mM).

As amostras de soro e LCR ou os pontos da curva foram diluídas em solução de ovoalbumina 0,2% e aplicados junto com tampão Tris em uma placa de 96 poços previamente recoberta com anticorpo monoclonal anti-S100B (clone SH-B1) por 12 a  $4^{\circ}\text{C}$  e bloqueada com ovoalbumina 2% por 1 h a temperatura ambiente. Após 2 h de incubação a  $37^{\circ}\text{C}$  em placa de aquecimento, a placa foi lavada com solução de lavagem (PBS contendo 0,1% de ovoalbumina e 0,005% de Tween 20) e incubada por 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  com solução de anticorpo anti-S100B produzido em coelho. Após nova lavagem, a placa foi novamente incubada por mais 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  com solução de anticorpo anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase. A solução de substrato, *o*-fenilenediamina e peróxido de hidrogênio, foi incubada por mais 30 minutos a temperatura ambiente e protegido da luz e a reação de formação de cor foi parada com adição de solução 3M ácido clorídrico. A leitura da absorbância foi realizada em 492 nm e uma curva padrão de S100B, variando de 0,002 a 1 ng/mL foi utilizada para calcular a concentração de S100B nas amostras.

Para as amostras de tecido cerebral, um protocolo semelhante foi utilizado (Leite et al., 2008). Para essas amostras, os anticorpos anti-S100B produzido em coelho e anti-IgG

de coelho foram incubados simultaneamente, durante 1 h a 37°C em placa de aquecimento. Esse protocolo possui maior linearidade e menor sensibilidade e a curva padrão de S100B variou de 0,02 a 10 ng/mL.

Os resultados foram expressos em ng/mL para soro e LCR e em ng S100B/ $\mu$ g proteína para as amostras de tecido cerebral.

### 3.10. GFAP

A medida de GFAP em córtex cerebral e hipocampo foi realizada segundo Tramontina (Tramontina et al., 2007). As amostras de tecido cerebral foram congeladas a -80°C após isoladas e, na hora da dosagem, foram homogeneizadas em tampão fosfato 0,1M, contendo PMSF (1 mM) e EGTA (1 mM). Uma placa de 96 poços foi incubada com as amostras ou pontos da curva padrão, diluídos em albumina bovina 1ng/ $\mu$ L a 4°C por 12 h. Após a lavagem e bloqueio com solução de leite desnatado a 5% em tampão tris, uma solução de anticorpo anti-GFAP produzido em coelho foi incubado durante 1 h a temperatura ambiente. Após, a placa foi lavada e incubada novamente durante 1 h a temperatura ambiente com solução de anticorpo anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase. Por fim, uma solução de *o*-fenilenediamina e peróxido de hidrogênio foi adicionada por 30 minutos protegido da luz. A reação de cor foi finalizada por adição de solução 3M de ácido clorídrico e a absorbância foi medida em 492 nm. A concentração de GFAP nas amostras foi calculada com base na curva padrão, que variou de 0,1 a 10 ng de GFAP/poço e os resultados foram expressos em ng GFAP/ $\mu$ g proteína.

### 3.11. Medida da concentração de aminoácidos

As amostras de soro foram desproteinizadas com metanol na proporção de 1:4 (v/v) e, após centrifugação a 2000 xg por 10 minutos, o sobrenadante foi utilizado para as análises. As amostras de soro desproteinizadas e de LCR foram então diluídas em solução contendo ácido homocisteico (padrão externo), mercaptoetanol (agente derivatizador) e *o*-ftaldeído (sonda fluorescente).

A análise quantitativa dos aminoácidos glutamato e Phe foi realizada segundo por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC Shimadzu) utilizando detector de fluorescência (Shimadzu RF-535). A taxa de fluxo utilizada foi de 1,4 mL/min e a duração de cada análise foi de aproximadamente 50 minutos (Joseph and Marsden, 1986). Os dados são expressos em  $\mu\text{mol/L}$ .

### 3.12. Medida da concentração de proteínas

As proteínas foram dosadas segundo técnica de Lowry (Lowry et al., 1951) modificada por Peterson (Peterson, 1977).

### 3.13. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo software SPSS 20.0. Para a comparação entre os diferentes grupos amostrais foi realizada análise da variância de uma via (ANOVA), seguida de pós teste de Duncan. Foi considerada diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

### 4.1. Efeito do modelo de HPA e do exercício físico sobre as concentrações de Phe no soro e de glutamato no LCR de ratos

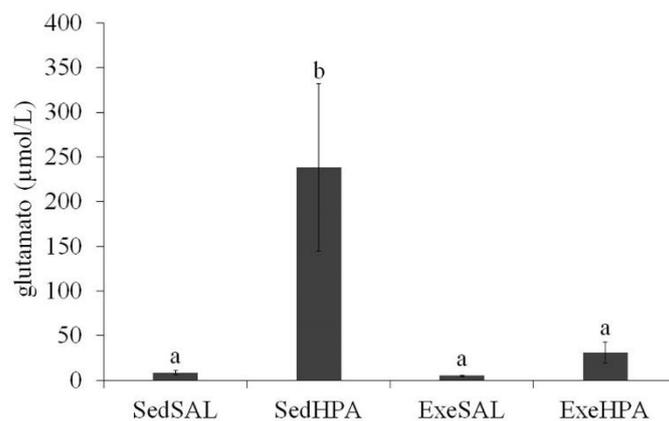
Os ratos submetidos ao modelo de HPA, independente da realização exercício físico (grupos SedHPA e ExeHPA), apresentaram concentrações elevadas de Phe no soro quando comparados com os animais controle (SedSAL), mostrando que a indução do modelo foi efetiva (Tabela 1).

**Tabela 1. Efeito do modelo de HPA e do exercício físico sobre a concentração de Phe no soro de ratos**

Tratamento	Phe ( $\mu\text{mol/L}$ )
SedSAL	$11,44 \pm 2,61^a$
SedHPA	$42,00 \pm 5,88^b$
ExeSAL	$18,73 \pm 1,46^a$
ExeHPA	$49,24 \pm 7,20^b$

Os dados estão apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão para um número de 6 animais por grupo. As letras diferentes indicam diferença significativa, utilizando ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Duncan, considerando  $p < 0,05$ .

Para investigar um possível efeito excitotóxico induzido por HPA, nós medimos a concentração de glutamato no LCR dos animais. Nós observamos um aumento significativo da concentração de glutamato no LCR no grupo SedHPA em reação ao grupo controle (SedSAL), o qual não foi observado quando os animais foram submetidos ao exercício físico juntamente à indução de HPA (ExeHPA) (Fig. 3).



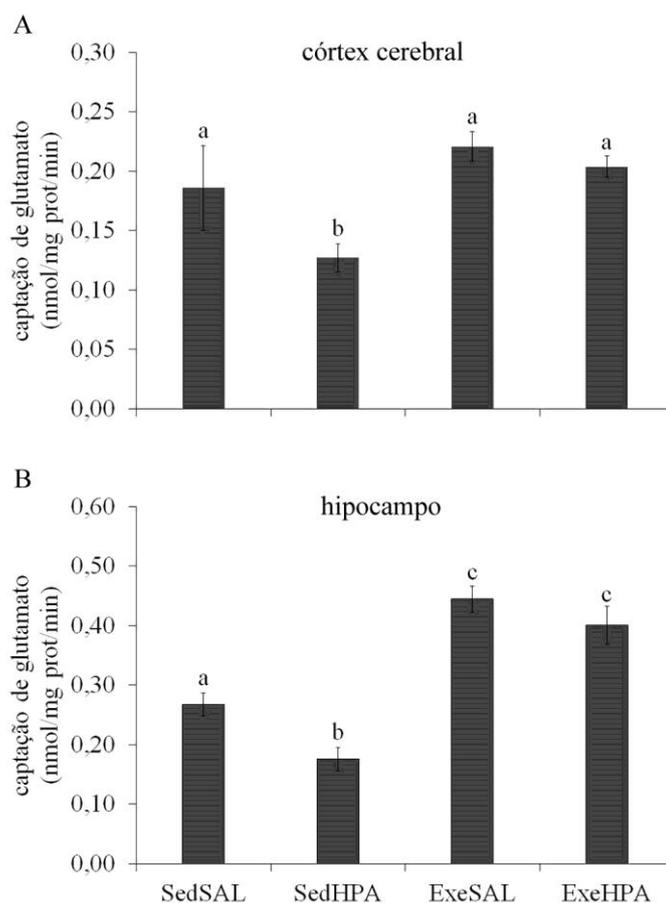
**Figura 3. Efeito do modelo de HPA e do exercício físico sobre a concentração de glutamato no LCR de ratos.** O LCR dos animais foi obtido para a medida de glutamato por HPLC. Foram utilizados de 6 a 9 animais por grupo. Os dados estão apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão. As letras diferentes indicam diferença significativa, utilizando ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Duncan, considerando  $p < 0,05$ .

#### 4.2. Efeito do modelo de HPA e do exercício físico sobre a captação de glutamato em córtex cerebral e hipocampo de ratos

Uma vez que o modelo de HPA induziu um aumento na concentração líquórica de glutamato, resolvemos investigar se esse aumento poderia ser devido a um efeito sobre a captação do glutamato extracelular. Em córtex cerebral, o modelo de HPA foi capaz de reduzir a captação de glutamato (SedHPA), o que foi impedido quando os animais foram submetidos ao exercício juntamente com a indução do modelo (ExeHPA). O exercício físico por si só (ExeSAL) não foi capaz de modular a captação de glutamato em córtex cerebral, quando comparado ao grupo controle (SedSAL) (Fig. 4A).

A mesma redução da captação de glutamato induzida pelo modelo de HPA observada em córtex cerebral também ocorreu em hipocampo. Por outro lado, nesse tecido, o exercício físico (ExeSAL) aumentou a captação de glutamato e, quando realizado junto à indução do modelo (ExeHPA) não apenas impediu a redução observada nessa condição,

como manteve os valores de captação elevados quando comparado ao grupo controle (SedSAL) (Fig.4B).

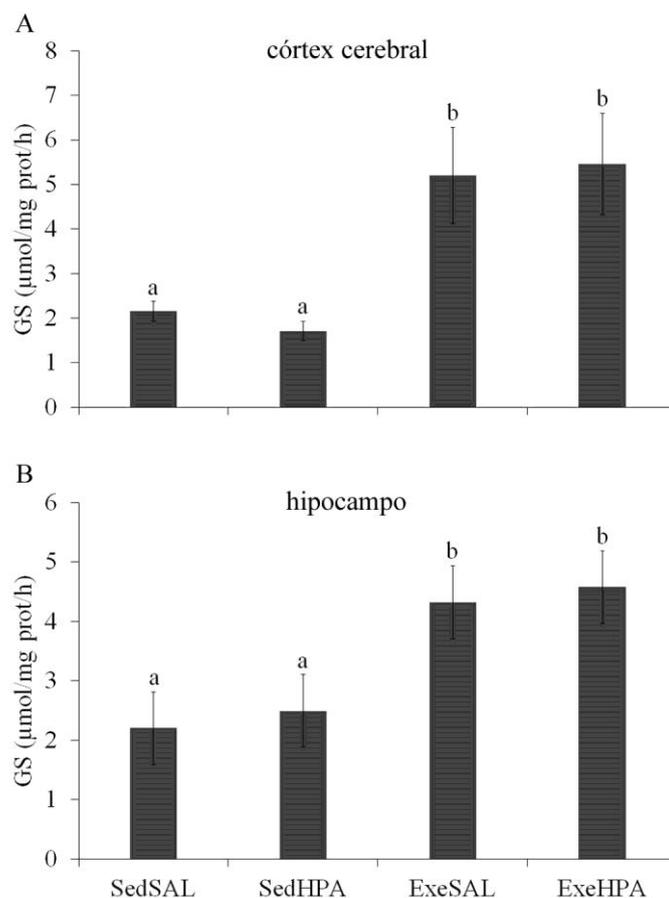


**Figura 4. Efeito do modelo de HPA e do exercício físico sobre a captação de glutamato em córtex cerebral e hipocampo de ratos.** Fatias de córtex cerebral (A) ou hipocampo (B) de ratos submetidos ao modelo de HPA e/ou exercício físico foram isoladas para a medida da captação de glutamato. Foram utilizados de 6 a 8 animais por grupo. Os dados estão apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão. As letras diferentes indicam diferença significativa, utilizando ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Duncan, considerando  $p < 0,05$ .

#### 4.3. Efeito do modelo de HPA e do exercício físico sobre a atividade da GS e o conteúdo de GSH em córtex cerebral e hipocampo de ratos

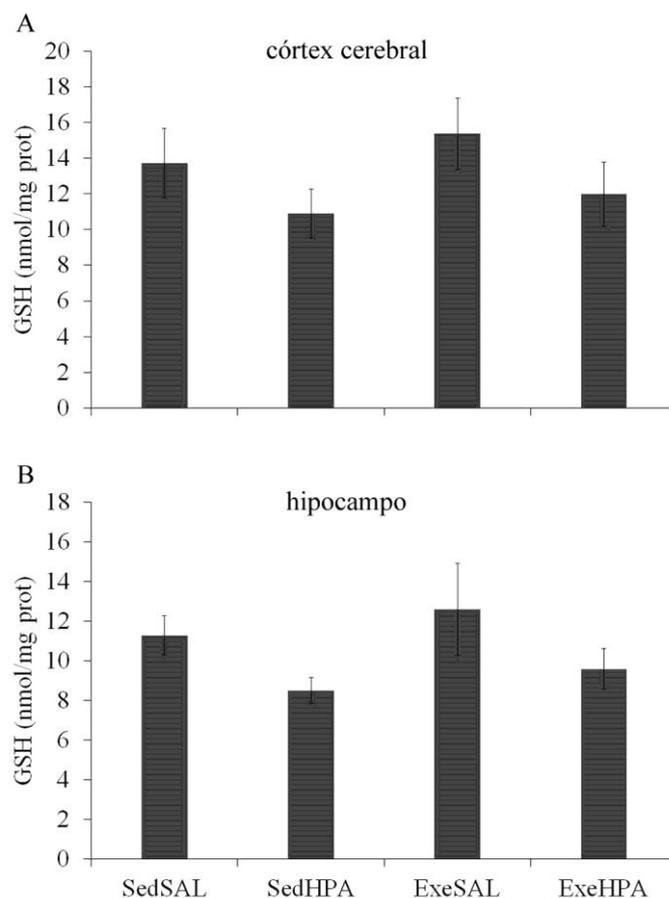
Para avaliar o metabolismo de glutamato, investigamos também a atividade da enzima GS, que utiliza glutamato como substrato, bem como o conteúdo de GSH, um antioxidante cerebral que utiliza glutamato em sua síntese.

A atividade da enzima GS, em córtex cerebral (Fig. 5A), bem como em hipocampo (Fig. 5B) não se mostrou alterada com a indução do modelo (SedHPA). Entretanto, em ambos os tecidos, o exercício físico, independente da indução de HPA (grupos ExeSAL e ExeHPA) se mostrou capaz de aumentar a atividade dessa enzima quando comparado ao grupo controle (SedSAL).



**Figura 5. Efeito do modelo de HPA e do exercício físico sobre a atividade da GS em córtex cerebral e hipocampo de ratos.** Fatias de córtex cerebral (A) ou hipocampo (B) de ratos submetidos ao modelo de HPA e/ou exercício físico foram isoladas para a medida da atividade da GS. Foram utilizados de 8 a 10 animais por grupo. Os dados estão apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão. As letras diferentes indicam diferença significativa, utilizando ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Duncan, considerando  $p < 0,05$ .

O conteúdo do tripeptídeo GSH não foi alterado em córtex cerebral (Fig. 6A), ou em hipocampo (Fig. 6B). O exercício físico também não se mostrou capaz de modular a concentração de GSH em ambos os tecidos estudados.

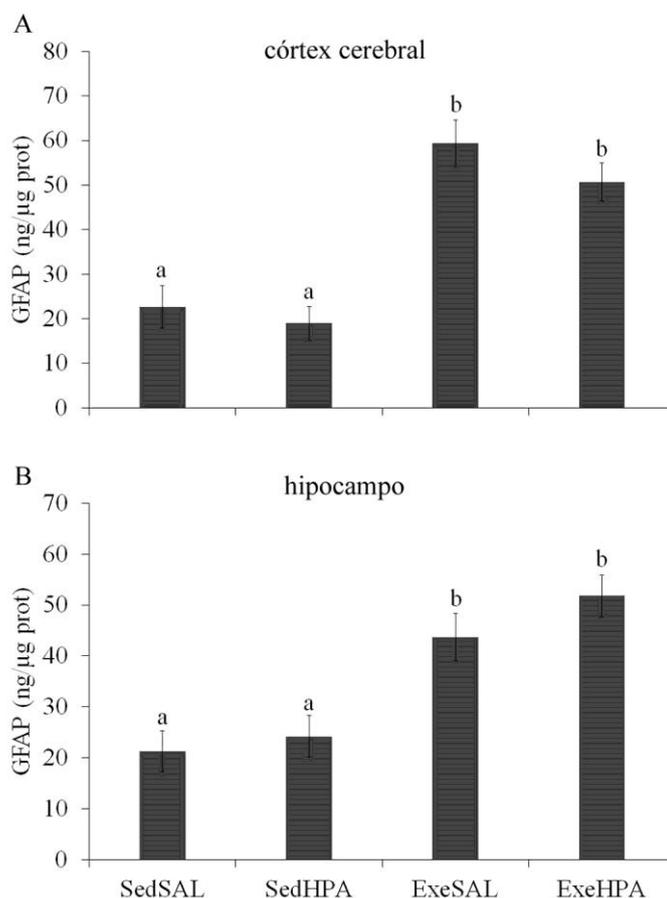


**Figura 6. Efeito do modelo de HPA e do exercício físico sobre o conteúdo de GSH em córtex cerebral e hipocampo de ratos.** Fatias de córtex cerebral (A) ou hipocampo (B) de ratos submetidos ao modelo de HPA e/ou exercício físico foram isoladas para a medida do conteúdo de GSH. Foram utilizados de 8 a 10 animais por grupo. Os dados estão apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão.

#### 4.4. Efeito do modelo de HPA e do exercício físico sobre a concentração de GFAP e S100B em córtex cerebral e hipocampo de ratos

Considerando que a atividade da GS e a captação de glutamato, estudadas anteriormente, são parâmetros característicos de astrócitos e se mostraram alterados pelo treinamento físico e/ou indução de HPA, resolvemos estudar duas proteínas envolvidas na ativação astrocitária, a S100B e a GFAP. Nossos resultados mostram que o modelo de HPA não alterou o imunocontéudo de GFAP, tanto em córtex cerebral (Fig. 7A) quanto em hipocampo (Fig. 7B). Por outro lado, o treinamento físico (grupos ExeSAL e

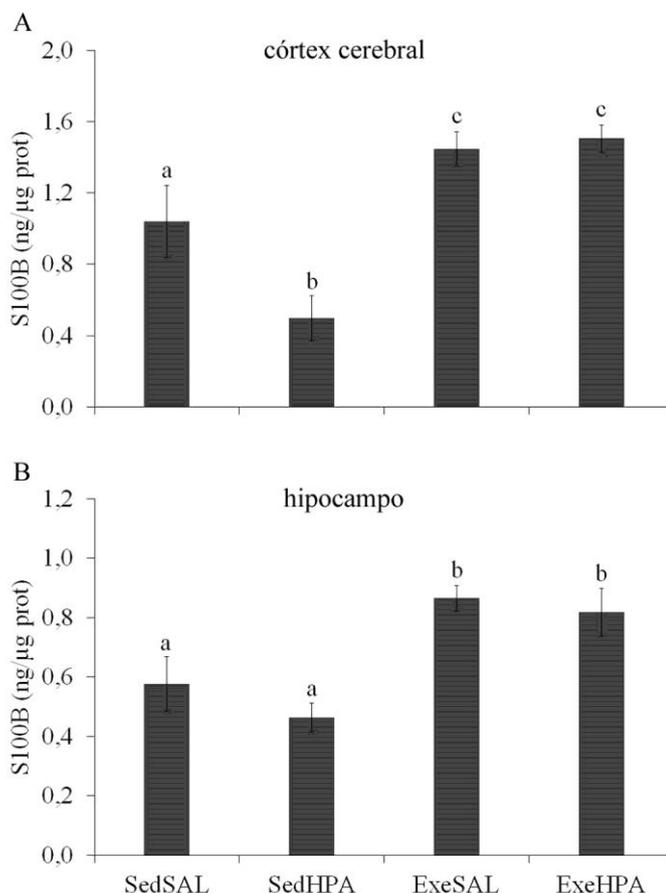
ExeHPA) aumentou a concentração de GFAP em ambos os tecidos analisados (Fig. 7). Entretanto, não foi observada diferença significativa entre os grupos exercitados (ExeSAL e ExeHPA).



**Figura 7. Efeito do modelo de HPA e do exercício físico sobre a concentração de GFAP em córtex cerebral e hipocampo de ratos.** Fatias de córtex cerebral (A) ou hipocampo (B) de ratos submetidos ao modelo de HPA e/ou exercício físico foram isoladas para a medida da concentração de GFAP. Foram utilizados de 8 a 10 animais por grupo. Os dados estão apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão. As letras diferentes indicam diferença significativa, utilizando ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Duncan, considerando  $p < 0,05$ .

Com relação à S100B, a indução do modelo (SedHPA) foi capaz de diminuir sua concentração em córtex cerebral (Fig. 8A), mas não em hipocampo (Fig. 8B). Entretanto, o efeito do treinamento físico foi igual nos dois tecidos, observando-se um aumento na concentração de S100B nos animais exercitados (grupos ExeSAL e ExeHPA) quando

comparados ao grupo controle (SedSAL) (Fig. 8). Dessa forma, o treinamento físico impediu a queda de S100B observada em córtex cerebral (Fig. 8A).

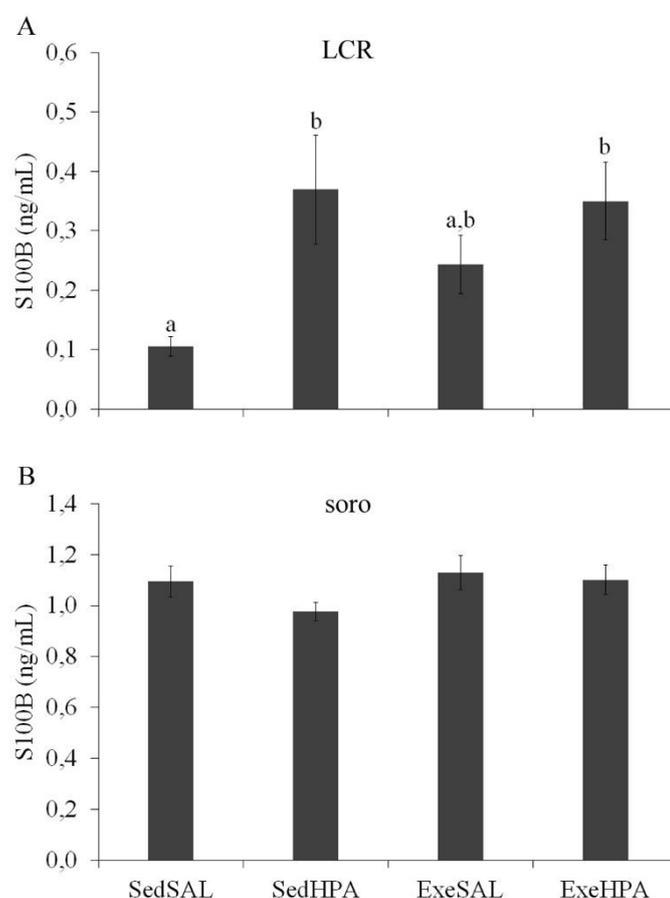


**Figura 8. Efeito do modelo de HPA e do exercício físico sobre a concentração de S100B em córtex cerebral e hipocampo de ratos.** Fatias de córtex cerebral (A) ou hipocampo (B) de ratos submetidos ao modelo de HPA e/ou exercício físico foram isoladas para a medida da concentração de S100B. Foram utilizados de 8 a 10 animais por grupo. Os dados estão apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão. As letras diferentes indicam diferença significativa, utilizando ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Duncan, considerando  $p < 0,05$ .

#### 4.5. Efeito do modelo de HPA e do exercício físico sobre a concentração de S100B no LCR e soro de ratos

Uma vez que a concentração tecidual de S100B se mostrou alterada no tecido cerebral, resolvemos avaliar a concentração extracelular de S100B, dosando essa proteína

em amostras de LCR e soro dos animais. O modelo de HPA (SedHPA) foi capaz de aumentar a concentração de S100B no LCR quando comparado ao grupo controle (SedSAL). Entretanto, o treinamento físico não foi capaz de modular a concentração líquórica de S100B por si só (ExeSAL), tampouco modulou o aumento de S100B observado com a indução do modelo (Fig. 9A). Não foi observado nenhum efeito sobre a concentração sérica de S100B com a indução do modelo ou com o treinamento físico (Fig. 9B).



**Figura 9. Efeito do modelo de HPA e do exercício físico sobre a concentração de S100B no LCR e soro de ratos.** Amostras de LCR (A) ou soro (B) de ratos submetidos ao modelo de HPA e/ou exercício físico foram coletadas para a medida da concentração de S100B. Foram utilizados de 6 a 8 animais por grupo. Os dados estão apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão. As letras diferentes indicam diferença significativa, utilizando ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Duncan, considerando  $p < 0,05$ .

## 5. Discussão

5.1. O modelo de HPA induziu excitotoxicidade glutamatérgica em ratos, o que não ocorreu nos animais submetidos a treinamento físico.

A excitotoxicidade gluamatérgica é caracterizada por um aumento da concentração extracelular de glutamato e consequente ativação exacerbada dos receptores glutamatérgicos pós-sinápticos, o que promove um influxo aumentado de cálcio no neurônio, levando à toxicidade e morte neuronal (Choi, 1987; Limbrick et al., 1995; Olney, 1982). Esse mecanismo tóxico é característico de diversas doenças neurodegenerativas (Hoekstra et al., 2015; Van Laar et al., 2015; Zadori et al., 2014; Zumkehr et al., 2015); entretanto, poucos são os estudos envolvendo os erros inatos do metabolismo (Kolker et al., 2004) e, portanto, a PKU, ainda que essas doenças possuam algumas semelhanças de sintomas, como o déficit cognitivo.

Considerando o exposto acima, alguns estudos já foram realizados na tentativa de se elucidar um possível efeito da Phe sobre a transmissão sináptica glutamatérgica. Em culturas primárias neuronais expostas agudamente a altas concentrações de Phe, comparáveis às observadas nos pacientes fenilcetonúricos, foi observada uma inibição da atividade glutamatérgica, mediada pela inibição de receptores AMPA e NMDA, sem alteração da transmissão GABAérgica (Glushakov et al., 2003; Glushakov et al., 2005; Martynyuk et al., 2005). Entretanto, estudos em animais transgênicos para PKU, camundongos *Pah<sup>emu2</sup>*, mostraram um aumento pronunciado da expressão proteica da subunidade NR2A do receptor glutamatérgico, bem como do receptor AMPA (subunidades Glu 1, 2 e 3), com uma pequena redução da subunidade NR2B (Glushakov et al., 2005). Além disso, um estudo em neurônios corticais expostos à Phe mostrou um aumento da expressão gênica de receptores metabotrópicos e também do tipo NMDA (Zhang and Gu, 2005). Dessa forma, considerando uma atividade sináptica inibida pela

Phe, mas um aumento da densidade de receptores glutamatérgicos neuronais, pode-se concluir que a Phe causa alterações sinápticas glutamatérgicas, mas que seu efeito ainda não é completamente elucidado e, portanto, requer uma maior investigação.

Outro fator importante a ser levado em consideração é que os estudos, até o presente momento, foram realizados em sua maioria em culturas de neurônios isolados, o que traz importantes informações moleculares sobre o efeito direto da Phe sobre esse tipo celular, mas desconsidera o papel essencial dos astrócitos nesse tipo de sinapse e um possível efeito da Phe sobre essas células. Em nosso trabalho, mostramos pela primeira vez, um efeito da indução de HPA sobre as concentrações extracelulares e o metabolismo de glutamato cerebral em um modelo de HPA crônico *in vivo*. Nós observamos um aumento da concentração de glutamato no LCR, acompanhado de uma redução na captação de glutamato em córtex cerebral e hipocampo dos animais submetidos a HPA. Isso sugere fortemente que a exposição crônica a Phe pode levar a um quadro de excitotoxicidade glutamatérgica, que poderia ser responsável, pelo menos em parte, pelos sintomas observados nos pacientes fenilcetonúricos, que incluem epilepsia (Surtees and Blau, 2000).

Os astrócitos estão sendo estudados como importantes alvos terapêuticos em diferentes doenças cerebrais (Finsterwald et al., 2015; Jain et al., 2015; Rossi, 2015). Nós acreditamos que a PKU pode ser mais uma dessas doenças, uma vez que a remoção de glutamato da fenda sináptica, alterada no modelo de HPA, ocorre principalmente por esse tipo celular, o que indica que a Phe e talvez seus metabólitos devam estar agindo nos astrócitos. Isso poderia acarretar o desenvolvimento de excitotoxicidade, levando ao comprometimento neuronal observado na doença. Entretanto, um efeito direto da Phe ou de seus metabólitos em astrócitos ainda não foi investigado.

Outra estratégia terapêutica que está sendo estudada para muitas doenças que acometem o SNC é a prática de exercício físico (Mirochnic et al., 2009; Rodrigues et al., 2010; Smith and Zigmond, 2003), por não ser invasiva e já ter mostrado excelentes resultados, inclusive por atuar em parâmetros de ativação astrogliar (Rodrigues et al., 2010). Nossos resultados mostraram que os animais submetidos ao treinamento físico não apresentaram a redução da captação de glutamato e as concentrações aumentadas de glutamato no LCR observadas nos animais sedentários com HPA induzida. Isso sugere que o treinamento físico pode ser um adjuvante no tratamento da PKU. De fato, trabalhos anteriores de nosso grupo já identificaram um papel protetor do treinamento físico em ratos submetidos ao modelo de HPA e em camundongos transgênicos *Pah<sup>enu2</sup>* no que se refere ao estresse oxidativo (Mazzola et al., 2015; Mazzola et al., 2011). É importante ressaltar que o efeito observado com o exercício físico em nosso estudo não está relacionado com uma redução da concentração sérica de Phe. Entretanto, não podemos descartar alterações na concentração cerebral de Phe, que não foram avaliadas nesse trabalho.

Uma vez que o glutamato é precursor de GSH e, apesar do estresse oxidativo já estar bem documentado na PKU (He et al., 2014; Mazzola et al., 2015; Moraes et al., 2013), não observamos alteração na concentração de GSH em córtex cerebral ou hipocampo dos animais com HPA induzida. Um recente estudo da literatura mostrou uma redução de GSH em cérebro total de camundongos transgênicos para PKU, que foi revertida por exercício físico voluntário (Mazzola et al., 2015). Da mesma forma, a atividade da enzima GS, que utiliza glutamato como substrato, não foi alterada pela indução do modelo de HPA em nosso estudo.

5.2. O modelo de HPA induziu alterações na S100B cerebral, que foram parcialmente evitadas quando os animais foram submetidos a treinamento físico, sem alterar a concentração de GFAP.

A S100B é uma proteína produzida e secretada por astrócitos que está envolvida na patofisiologia de diversas doenças neurodegenerativas (Donato, 2001; Donato et al., 2009; Goncalves et al., 2008; Peskind et al., 2001; Petzold et al., 2003). Aparentemente, essa proteína pode estar envolvida também na patofisiologia de erros inatos do metabolismo, uma vez que foi observado um aumento da secreção de S100B em células de glioma C6 expostas a  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada, encontrados acumulados na doença da urina do xarope do bordo (Funchal et al., 2007). Entretanto, poucos estudos foram realizados relacionando erros inatos do metabolismo e S100B e a maior parte do conhecimento que se tem até hoje sobre o papel da S100B em doenças cerebrais foi estudado em doenças neurodegenerativas.

No nosso trabalho, observamos uma redução da concentração intracelular de S100B em córtex cerebral, que não foi observada em hipocampo, mostrando uma vulnerabilidade maior dessa região cerebral à indução de HPA. Essa redução poderia indicar uma hipofunção astrocitária, uma vez que a S100B intracelular possui funções modulatórias sobre o citoesqueleto e a homeostase de cálcio intracelular, por exemplo (Donato et al., 2009). Nós acreditamos que esse efeito sobre a S100B intracelular pode estar relacionado com o comprometimento das funções cerebrais observado nos pacientes PKU.

O efeito protetor do exercício físico em doenças que acometem o SNC é bastante documentado (Paillard et al., 2015; Rodrigues et al., 2010; Rossi et al., 2009; Tapia-Rojas et al., 2015). Em modelo experimental de HPA, o treinamento físico foi capaz de impedir a redução de triptofano e o aumento do estresse oxidativo gerado pela indução do modelo

em cérebro de ratos (Mazzola et al., 2012; Mazzola et al., 2011). O exercício físico, em nosso trabalho, foi capaz de evitar a redução de S100B em córtex cerebral, mostrando-se mais uma vez protetor para os efeitos induzidos pelo modelo de HPA, sintoma característico da PKU.

Tendo em vista o papel da S100B em doenças neurodegenerativas, que são acompanhadas de déficit cognitivo e falhas nos processos de memória e aprendizagem, a maior parte dos trabalhos são realizados em hipocampo, onde resultados controversos vêm sendo encontrados no que diz respeito à concentração intracelular de S100B. Uma redução de S100B em hipocampo foi observada em modelos de demência induzidos por injeção de ácido ibotênico no núcleo basal magnocelular de ratos (Swarowsky et al., 2008). Entretanto, no modelo de demência induzido por injeção intracerebroventricular de estreptozotocina, um aumento de S100B foi observado no hipocampo (Rodrigues et al., 2009). Em modelo de demência induzido por injeção intra-hipocampal de ácido ocaídico não foram encontradas alterações na concentração de S100B no hipocampo (Costa et al., 2012). Em nosso estudo, não observamos variações na concentração hipocampal de S100B.

Uma vez que a S100B pode ser secretada por astrócitos no SNC e que tem funções extracelulares importantes, como a sinalização para sobrevivência ou morte celular (Donato et al., 2009; Van Eldik and Wainwright, 2003), variações na sua concentração no LCR podem estar envolvidas com o comprometimento das funções cerebrais observado em diferentes doenças. Entretanto, é importante ressaltar que, apesar de o mecanismo de secreção da S100B ainda não ser completamente elucidado, estudos em culturas primárias de astrócitos mostram que variações na concentração extracelular de S100B nem sempre estão relacionadas com variações na sua concentração intracelular,

uma vez que apenas uma pequena fração dessa proteína é secretada comparada ao seu conteúdo intracelular (Leite et al., 2004).

No nosso trabalho, observamos um aumento da concentração de S100B no LCR induzido pelo modelo do HPA. Acreditamos que esse aumento pode estar envolvido com os sintomas neurológicos observados nos pacientes com PKU. Estudos *in vitro* mostram que a S100B em baixas concentrações tem efeitos tróficos sobre células neuronais e, em concentrações elevadas, possui efeitos tóxicos (Donato et al., 2009; Van Eldik and Wainwright, 2003). Apesar de não se ter ainda informações sobre a concentração de S100B no LCR de pacientes acometidos por erros inatos do metabolismo, incluindo a PKU, sabe-se que pacientes no início do desenvolvimento da doença de Alzheimer possuem um aumento da concentração de S100B no LCR, que pode estar relacionado a progressão da doença (Peskind et al., 2001), corroborando nosso resultado. Entretanto, em modelos animais de indução crônica de demência, uma redução de S100B no LCR foi observada (Costa et al., 2012; Rodrigues et al., 2010). Outro dado interessante, que reforça nossa teoria, é que, em pacientes com doença de Alzheimer ou demência de lobo frontotemporal, o aumento de S100B encontrado no LCR está diretamente relacionado com a atrofia cerebral encontrada nesses pacientes (Petzold et al., 2003). Sabe-se que pacientes com PKU, dentre outras manifestações clínicas, podem apresentar microcefalia (Surtees and Blau, 2000). Dessa forma, podemos supor que o aumento de S100B induzido por HPA no LCR observado em nosso estudo, se também for observado em humanos, poderia ser uma das causas dessa alteração.

Apesar de ter se mostrado protetor no que diz respeito à captação de glutamato e à concentração intracelular de S100B, o treinamento físico não foi capaz de impedir o aumento da concentração de S100B no LCR dos animais submetidos ao modelo de HPA.

Esse dado reforça o fato de que a secreção de S100B é um processo altamente regulado e suas concentrações intra e extracelulares são moduladas de forma independente.

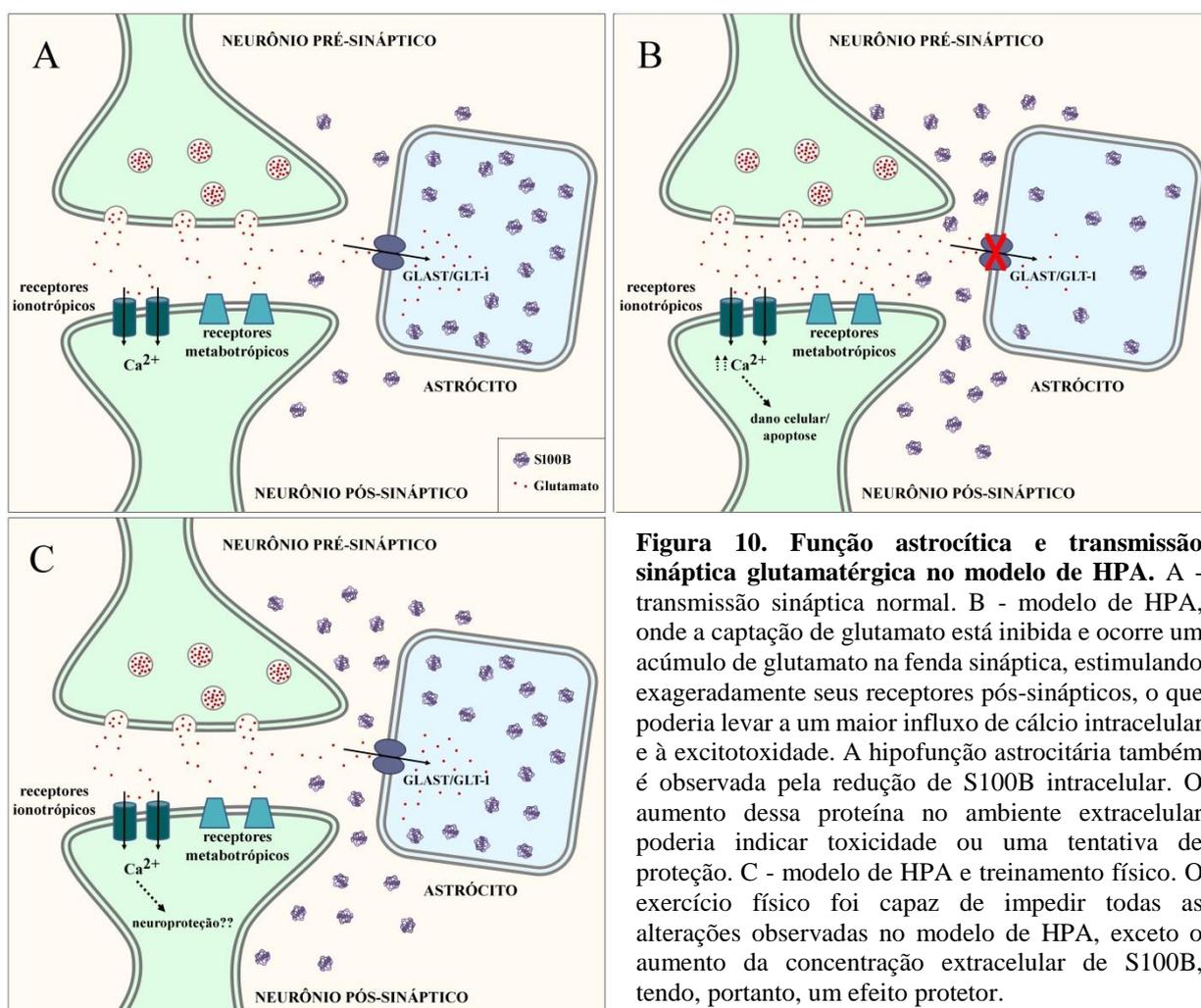
A S100B é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e atingir a circulação sanguínea e, portanto, pode ser considerada um marcador de dano cerebral (Goncalves et al., 2008). Entretanto, sabe-se que a S100B também é produzida e secretada por adipócitos, o que também pode contribuir para variações na sua concentração sérica (Buckman et al., 2014; Fujiya et al., 2014; Goncalves et al., 2010). De fato, estudos mostram que nem sempre variações na concentração de S100B no LCR são refletidas na circulação periférica. A indução de neuroinflamação, por exemplo, por injeção intracerebroventricular de lipopolissacarídeo, provoca um aumento na concentração de S100B no LCR sem alteração da S100B plasmática (Guerra et al., 2011).

No modelo de indução de HPA, não encontramos alteração na concentração plasmática de S100B. Existe apenas um estudo em humanos acometidos por PKU não tratados que mostra um aumento de S100B sérica (Schulpis et al., 2004). Nós acreditamos que essa diferença de resultado se deva a uma exposição de forma mais persistente às altas concentrações de Phe nos pacientes, uma vez que, em nosso modelo, as concentrações de Phe variam ao longo do dia, sendo mais altas imediatamente após as injeções. Outra possível explicação seria de que as concentrações séricas de S100B na PKU possam variar devido a outros fatores comprometidos na doença que não a HPA.

Outra proteína característica de astrócitos e que está envolvida em diversas doenças é a GFAP, uma proteína marcadora de gliose reativa (Eng et al., 2000; Pekny et al., 2014). Existem poucos trabalhos na literatura relacionando erros inatos do metabolismo com a proteína GFAP, a maioria com a doença da urina do xarope do bordo (de Lima Pelaez et

al., 2007; Funchal et al., 2007). Em nosso estudo, não observamos alteração na concentração de GFAP cerebral nas regiões analisadas.

As alterações encontradas no sistema glutamatérgico, bem como nas concentrações de S100B intra e extracelulares induzidas pelo modelo de HPA e o efeito do exercício físico estão resumidas na figura 10.



**Figura 10. Função astrocítica e transmissão sináptica glutamatérgica no modelo de HPA.** A - transmissão sináptica normal. B - modelo de HPA, onde a captura de glutamato está inibida e ocorre um acúmulo de glutamato na fenda sináptica, estimulando exageradamente seus receptores pós-sinápticos, o que poderia levar a um maior influxo de cálcio intracelular e à excitotoxicidade. A hipofunção astrocitária também é observada pela redução de S100B intracelular. O aumento dessa proteína no ambiente extracelular poderia indicar toxicidade ou uma tentativa de proteção. C - modelo de HPA e treinamento físico. O exercício físico foi capaz de impedir todas as alterações observadas no modelo de HPA, exceto o aumento da concentração extracelular de S100B, tendo, portanto, um efeito protetor.

### 5.3. O treinamento físico é capaz de modular a atividade astrocitária em animais saudáveis.

Sabe-se que o exercício físico é capaz de modular a homeostasia cerebral. Nesse trabalho, além dos efeitos benéficos do treinamento físico nos ratos submetidos ao modelo de HPA, também pudemos observar efeitos do exercício físico nos parâmetros testados, quando comparamos os animais sedentários (SedSAL) com os animais treinados (ExeSAL).

Muitos estudos sugerem um efeito do treinamento físico sobre a concentração hipocampal de GFAP. Alguns trabalhos não encontraram variações (de Senna et al., 2011; Santin et al., 2011), ou até mesmo uma redução da concentração de GFAP (Bernardi et al., 2013). Entretanto, a maior parte dos resultados até o presente momento sugere um aumento no conteúdo hipocampal de GFAP (Li et al., 2005; Rodrigues et al., 2010; Saur et al., 2014), que é acompanhado de aumento na proliferação de astrócitos (Li et al., 2005; Saur et al., 2014). Esse aumento na concentração de GFAP foi observado em córtex cerebral estriado e cérebro total de roedores (Li et al., 2005). Nosso estudo mostra um aumento da GFAP em hipocampo e córtex cerebral, corroborando os dados da literatura. Uma vez que esse aumento da GFAP é acompanhado de um aumento da angiogênese cerebral (Wang et al., 2014) e da neurogênese hipocampal (Uda et al., 2006), isso indica que o exercício físico pode estar contribuindo para o fortalecimento a unidade neurovascular.

O treinamento físico, em nosso modelo de estudo, foi capaz de aumentar a concentração de S100B em córtex cerebral e hipocampo, o que também pode indicar um aumento de trofismo celular. Esse aumento da concentração de S100B intracelular não foi refletido em aumento de secreção dessa proteína, uma vez que a concentração de

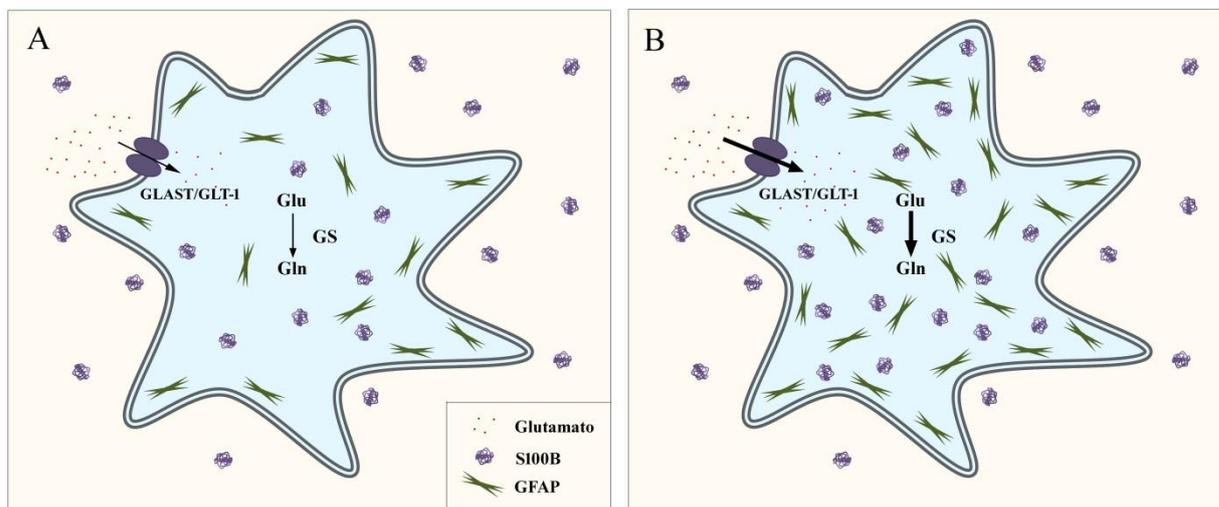
S100B no LCR dos animais exercitados não foi alterada. Poucos dados na literatura mostram efeitos do exercício físico sobre a proteína S100B em tecido cerebral, nos quais não foram encontradas alterações no conteúdo de S100B hipocampal (Santin et al., 2011), bem como na concentração de S100B no LCR (de Senna et al., 2011; Rodrigues et al., 2010). Similar ao nosso trabalho, uma tendência a aumento na concentração de S100B no LCR também já foi relatada (de Senna et al., 2011), mas sem diferença significativa.

Alguns trabalhos já relataram um aumento de S100B sérico estimulado pelo exercício físico (Dietrich et al., 2003; Stocchero et al., 2014). Entretanto, esse é um efeito agudo, medido logo após a atividade física, que pode estar relacionado ao mecanismo de reparo e regeneração muscular, uma vez que a S100B está envolvida com a proliferação de mioblastos (Sorci et al., 2013). Nosso trabalho não mostrou alterações na concentração sérica de S100B após exercício crônico.

Além do efeito sobre o trofismo astrocitário, o exercício físico, em nosso estudo, foi capaz de modular o metabolismo glutamatérgico. Nós observamos um aumento da captação de glutamato hipocampal, que não foi observado em outros estudos (Bernardi et al., 2013; Cechella et al., 2014; da Cunha et al., 2012) e tampouco em córtex cerebral. É importante ressaltar que esse aumento de captação não foi acompanhado de modificações na concentração de glutamato no LCR desses animais. Uma vez que nosso estudo foi realizado em animais jovens, diferentemente dos demais estudos, nós supomos que esse aumento na captação possa ser importante para o desenvolvimento do tecido hipocampal. Essa alteração da captação de glutamato foi acompanhada de um aumento da atividade da enzima GS, em córtex cerebral e hipocampo, já observado em outro trabalho (Bernardi et al., 2013), o que pode estar favorecendo o ciclo glutamato-glutamina e contribuindo para o desenvolvimento cerebral desses animais.

Muitos estudos já relataram efeitos antioxidantes no SNC estimulados pelo exercício físico. No que diz respeito à concentração de GSH cerebral, alguns estudos mostraram um aumento na sua concentração hipocampal (Rodrigues et al., 2009; Santin et al., 2011), mas a maior parte dos trabalhos não mostrou nenhuma alteração em córtex cerebral, estriado, hipocampo e cérebro total de roedores (Bernardi et al., 2013; Liu et al., 2000; Somani et al., 1995). Nosso trabalho não observou variações na concentração de GSH em córtex cerebral ou hipocampo. Não descartamos um efeito antioxidante do exercício físico no SNC; entretanto, esse efeito é provavelmente mediado por outras defesas, por exemplo, as enzimas antioxidantes, como já sugerido na literatura (Gomez-Cabrera et al., 2008).

Os efeitos do exercício físico no SNC dos ratos jovens estão representados na figura 11.



**Figura 11. Efeito do treinamento físico no cérebro de animais jovens.** A figura representa a função astrocítica nos animais sedentários, em A, e treinados, em B. Os animais treinados mostraram um maior trofismo astrocitário, com um aumento das concentrações intracelulares de S100B e GFAP. Além disso, a captação de glutamato (em hipocampo) e atividade da GS nesses animais está aumentada, favorecendo o ciclo glutamato-glutamina e, portanto, a detoxificação de glutamato e amônia cerebral.

## 6. Conclusões

De acordo com os dados obtidos nesse trabalho, mostramos pela primeira vez que o modelo de HPA, característica da PKU, tem um componente importante de excitotoxicidade glutamatérgica em sua fisiopatologia, característica essa que o treinamento físico foi capaz de impedir. Outra característica que também pode estar envolvida na fisiopatologia da doença, encontrada alterada em nosso trabalho, foi a alteração da concentração de S100B intra e extracelular no SNC, que foi parcialmente impedida de ocorrer quando os animais foram submetidos ao exercício físico. Esses dados mostram a importância dos astrócitos no desenvolvimento das alterações cerebrais observadas na PKU e reforça sua importância como alvos terapêuticos para essa doença.

Além disso, o treinamento físico nos animais jovens, alvos desse estudo, proporcionou um aumento do trofismo dos astrócitos, medido pelas alterações observadas na S100B, GFAP, atividade de GS e captação de glutamato. Esse dado reforça a importância da prática de atividade física para o desenvolvimento adequado do SNC, mesmo na ausência de situações patológicas.

## 7. Referências Bibliográficas

- Aksu, I., Topcu, A., Camsari, U.M., Acikgoz, O., 2009. Effect of acute and chronic exercise on oxidant-antioxidant equilibrium in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. *Neurosci Lett.* 452, 281-5.
- Al-Jarrah, M.D., Jamous, M., 2011. Effect of endurance exercise training on the expression of GFAP, S100B, and NSE in the striatum of chronic/progressive mouse model of Parkinson's disease. *NeuroRehabilitation.* 28, 359-63.
- Alaei, H., Moloudi, R., Sarkaki, A.R., 2008. Effects of treadmill running on mid-term memory and swim speed in the rat with Morris water maze test. *J Bodyw Mov Ther.* 12, 72-5.
- Barateiro, A., Afonso, V., Santos, G., Cerqueira, J.J., Brites, D., van Horsen, J., Fernandes, A., 2015. S100B as a Potential Biomarker and Therapeutic Target in Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol.*
- Beccafico, S., Riuzzi, F., Puglielli, C., Mancinelli, R., Fulle, S., Sorci, G., Donato, R., 2011. Human muscle satellite cells show age-related differential expression of S100B protein and RAGE. *Age (Dordr).* 33, 523-41.
- Bernardes, D., Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Karmally, S., Dellarole, A., Carvalho-Tavares, J., Bethea, J.R., 2015. Prior regular exercise improves clinical outcome and reduces demyelination and axonal injury in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurochem.*
- Bernardi, C., Tramontina, A.C., Nardin, P., Biasibetti, R., Costa, A.P., Vizueti, A.F., Batassini, C., Tortorelli, L.S., Wartchow, K.M., Dutra, M.F., Bobermin, L., Sesterheim, P., Quincozes-Santos, A., de Souza, J., Goncalves, C.A., 2013. Treadmill exercise induces hippocampal astroglial alterations in rats. *Neural Plast.* 2013, 709732.

- Blau, N., Belanger-Quintana, A., Demirkol, M., Feillet, F., Giovannini, M., MacDonald, A., Trefz, F.K., van Spronsen, F., European, P.K.U.c., 2010. Management of phenylketonuria in Europe: survey results from 19 countries. *Mol Genet Metab.* 99, 109-15.
- Blesa, J., Trigo-Damas, I., Quiroga-Varela, A., Jackson-Lewis, V.R., 2015. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat.* 9, 91.
- Boksha, I.S., Tereshkina, E.B., Burbaeva, G.S., 2000. Glutamine synthetase and glutamine synthetase-like protein from human brain: purification and comparative characterization. *J Neurochem.* 75, 2574-82.
- Broux, B., Gowing, E., Prat, A., 2015. Glial regulation of the blood-brain barrier in health and disease. *Semin Immunopathol.*
- Browne, R.W., Armstrong, D., 1998. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol.* 108, 347-52.
- Buckman, L.B., Anderson-Baucum, E.K., Hasty, A.H., Ellacott, K., 2014. Regulation of S100B in white adipose tissue by obesity in mice. *Adipocyte.* 3, 215-20.
- Caldani, M., Rolland, B., Fages, C., Tardy, M., 1982. Glutamine synthetase activity during mouse brain development. *Experientia.* 38, 1199-202.
- Cechella, J.L., Leite, M.R., da Rocha, J.T., Dobrachinski, F., Gai, B.M., Soares, F.A., Bresciani, G., Royes, L.F., Zeni, G., 2014. Caffeine suppresses exercise-enhanced long-term and location memory in middle-aged rats: Involvement of hippocampal Akt and CREB signaling. *Chem Biol Interact.* 223C, 95-101.
- Cheung, G., Sibille, J., Zapata, J., Rouach, N., 2015. Activity-Dependent Plasticity of Astroglial Potassium and Glutamate Clearance. *Neural Plast.* 2015, 109106.

- Chiang, L.M., Chen, W.Y., Yang, Y.C., Jeng, M.J., 2015. Elevation of the serum S100 protein concentration as a marker of ischemic brain damage in extreme preterm infants. *J Chin Med Assoc.*
- Choi, D.W., 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci.* 7, 369-79.
- Christ, S.E., 2003. Asbjorn Folling and the discovery of phenylketonuria. *J Hist Neurosci.* 12, 44-54.
- Costa, A.P., Tramontina, A.C., Biasibetti, R., Batassini, C., Lopes, M.W., Wartchow, K.M., Bernardi, C., Tortorelli, L.S., Leal, R.B., Goncalves, C.A., 2012. Neuroglial alterations in rats submitted to the okadaic acid-induced model of dementia. *Behav Brain Res.* 226, 420-7.
- da Cunha, M.J., da Cunha, A.A., Ferreira, A.G., Machado, F.R., Schmitz, F., Lima, D.D., Delwing, D., Mussulini, B.H., Wofchuk, S., Netto, C.A., Wyse, A.T., 2012. Physical exercise reverses glutamate uptake and oxidative stress effects of chronic homocysteine administration in the rat. *Int J Dev Neurosci.* 30, 69-74.
- de Lima Pelaez, P., Funchal, C., Loureiro, S.O., Heimfarth, L., Zamoner, A., Gottfried, C., Latini, A., Wajner, M., Pessoa-Pureur, R., 2007. Branched-chain amino acids accumulating in maple syrup urine disease induce morphological alterations in C6 glioma cells probably through reactive species. *Int J Dev Neurosci.* 25, 181-9.
- de Senna, P.N., Ilha, J., Baptista, P.P., do Nascimento, P.S., Leite, M.C., Paim, M.F., Goncalves, C.A., Achaval, M., Xavier, L.L., 2011. Effects of physical exercise on spatial memory and astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats. *Metab Brain Dis.* 26, 269-79.
- Dietrich, M.O., Tort, A.B., Schaf, D.V., Farina, M., Goncalves, C.A., Souza, D.O., Portela, L.V., 2003. Increase in serum S100B protein level after a swimming race. *Can J Appl Physiol.* 28, 710-6.

- Donato, R., 2001. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 33, 637-68.
- Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C., Giambanco, I., 2009. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta.* 1793, 1008-22.
- Drake, J.C., Wilson, R.J., Yan, Z., 2015. Molecular mechanisms for mitochondrial adaptation to exercise training in skeletal muscle. *FASEB J.*
- Dringen, R., Brandmann, M., Hohnholt, M.C., Blumrich, E.M., 2014. Glutathione-Dependent Detoxification Processes in Astrocytes. *Neurochem Res.*
- Dutra, M.F., Jaeger, M., Ilha, J., Kalil-Gaspar, P.I., Marcuzzo, S., Achaval, M., 2012. Exercise improves motor deficits and alters striatal GFAP expression in a 6-OHDA-induced rat model of Parkinson's disease. *Neurol Sci.* 33, 1137-44.
- Dyer, C.A., Kendler, A., Philibotte, T., Gardiner, P., Cruz, J., Levy, H.L., 1996. Evidence for central nervous system glial cell plasticity in phenylketonuria. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55, 795-814.
- Eng, L.F., Ghirnikar, R.S., Lee, Y.L., 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* 25, 1439-51.
- Fernstrom, J.D., Fernstrom, M.H., 2007. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *J Nutr.* 137, 1539S-1547S; discussion 1548S.
- Finsterwald, C., Magistretti, P.J., Lengacher, S., 2015. Astrocytes: New Targets for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Curr Pharm Des.* 21, 3570-81.
- Forestier, A., Douki, T., De Rosa, V., Beal, D., Rachidi, W., 2015. Combination of Abeta Secretion and Oxidative Stress in an Alzheimer-Like Cell Line Leads to the Over-

- Expression of the Nucleotide Excision Repair Proteins DDB2 and XPC. *Int J Mol Sci.* 16, 17422-44.
- Fujiya, A., Nagasaki, H., Seino, Y., Okawa, T., Kato, J., Fukami, A., Himeno, T., Uenishi, E., Tsunekawa, S., Kamiya, H., Nakamura, J., Oiso, Y., Hamada, Y., 2014. The role of S100B in the interaction between adipocytes and macrophages. *Obesity (Silver Spring)*. 22, 371-9.
- Funchal, C., Tramontina, F., Quincozes dos Santos, A., Fraga de Souza, D., Goncalves, C.A., Pessoa-Pureur, R., Wajner, M., 2007. Effect of the branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease on S100B release from glial cells. *J Neurol Sci.* 260, 87-94.
- Glushakov, A.V., Dennis, D.M., Sumners, C., Seubert, C.N., Martynyuk, A.E., 2003. L-phenylalanine selectively depresses currents at glutamatergic excitatory synapses. *J Neurosci Res.* 72, 116-24.
- Glushakov, A.V., Glushakova, O., Varshney, M., Bajpai, L.K., Sumners, C., Laipis, P.J., Embury, J.E., Baker, S.P., Otero, D.H., Dennis, D.M., Seubert, C.N., Martynyuk, A.E., 2005. Long-term changes in glutamatergic synaptic transmission in phenylketonuria. *Brain.* 128, 300-7.
- Gomez-Cabrera, M.C., Domenech, E., Vina, J., 2008. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med.* 44, 126-31.
- Goncalves, C.A., Leite, M.C., Nardin, P., 2008. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem.* 41, 755-63.

- Goncalves, C.A., Leite, M.C., Guerra, M.C., 2010. Adipocytes as an Important Source of Serum S100B and Possible Roles of This Protein in Adipose Tissue. *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2010, 790431.
- Goncalves, D., Karl, J., Leite, M., Rotta, L., Salbego, C., Rocha, E., Wofchuk, S., Goncalves, C.A., 2002. High glutamate decreases S100B secretion stimulated by serum deprivation in astrocytes. *Neuroreport.* 13, 1533-5.
- Gottfried, C., Tramontina, F., Goncalves, D., Goncalves, C.A., Moriguchi, E., Dias, R.D., Wofchuk, S.T., Souza, D.O., 2002. Glutamate uptake in cultured astrocytes depends on age: a study about the effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Mech Ageing Dev.* 123, 1333-40.
- Guerra, M.C., Tortorelli, L.S., Galland, F., Da Re, C., Negri, E., Engelke, D.S., Rodrigues, L., Leite, M.C., Goncalves, C.A., 2011. Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. *J Neuroinflammation.* 8, 128.
- Gutteridge, J.M., Halliwell, B., 1992. Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Free Radic Biol Med.* 12, 93-5.
- Guttler, F., 1980. Hyperphenylalaninemia: diagnosis and classification of the various types of phenylalanine hydroxylase deficiency in childhood. *Acta Paediatr Scand Suppl.* 280, 1-80.
- Guttler, F., Lou, H., 1986. Dietary problems of phenylketonuria: effect on CNS transmitters and their possible role in behaviour and neuropsychological function. *J Inherit Metab Dis.* 9 Suppl 2, 169-77.
- Hahn, J., Wang, X., Margeta, M., 2015. Astrocytes increase the activity of synaptic GluN2B NMDA receptors. *Front Cell Neurosci.* 9, 117.

- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys.* 246, 501-14.
- Hanson, E., Armbruster, M., Cantu, D., Andresen, L., Taylor, A., Danbolt, N.C., Dulla, C.G., 2015. Astrocytic glutamate uptake is slow and does not limit neuronal NMDA receptor activation in the neonatal neocortex. *Glia.* 63, 1784-96.
- Harding, C.O., 2010. New era in treatment for phenylketonuria: Pharmacologic therapy with sapropterin dihydrochloride. *Biologics.* 4, 231-6.
- Hasselblatt, M., Mooren, F.C., von Ahsen, N., Keyvani, K., Fromme, A., Schwarze-Eicker, K., Senner, V., Paulus, W., 2004. Serum S100beta increases in marathon runners reflect extracranial release rather than glial damage. *Neurology.* 62, 1634-6.
- He, Y.Z., Gu, X.F., Lu, L.H., Liang, L.L., 2014. The oxidative molecular regulation mechanism of NOX in children with phenylketonuria. *Int J Dev Neurosci.* 38, 178-83.
- Herbst, E.A., Holloway, G.P., 2015. Exercise training normalizes mitochondrial respiratory capacity within the striatum of the R6/1 model of Huntington's disease. *Neuroscience.* 303, 515-23.
- Herrero, E., Aragon, M.C., Gimenez, C., Valdivieso, F., 1983. Inhibition by L-phenylalanine of tryptophan transport by synaptosomal plasma membrane vesicles: implications in the pathogenesis of phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis.* 6, 32-5.
- Hoekstra, J.G., Cook, T.J., Stewart, T., Mattison, H., Dreisbach, M.T., Hoffer, Z.S., Zhang, J., 2015. Astrocytic dynamin-like protein 1 regulates neuronal protection against excitotoxicity in Parkinson disease. *Am J Pathol.* 185, 536-49.

- Jain, P., Wadhwa, P.K., Jadhav, H.R., 2015. Reactive Astrogliosis: Role in Alzheimer's Disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 14, 872-9.
- Ji, E.S., Kim, Y.M., Shin, M.S., Kim, C.J., Lee, K.S., Kim, K., Ha, J., Chung, Y.R., 2015. Treadmill exercise enhances spatial learning ability through suppressing hippocampal apoptosis in Huntington's disease rats. *J Exerc Rehabil*. 11, 133-9.
- Joseph, M.H., Marsden, C.A., 1986. HPLC of small molecules, a practical approach, Vol. 222, IRL Press, Oxford.
- Kashihara, K., Maruyama, T., Murota, M., Nakahara, Y., 2009. Positive effects of acute and moderate physical exercise on cognitive function. *J Physiol Anthropol*. 28, 155-64.
- Kienzle Hagen, M.E., Pederzolli, C.D., Sgaravatti, A.M., Bridi, R., Wajner, M., Wannmacher, C.M., Wyse, A.T., Dutra-Filho, C.S., 2002. Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. *Biochim Biophys Acta*. 1586, 344-52.
- Kim, H.B., Jang, M.H., Shin, M.C., Lim, B.V., Kim, Y.P., Kim, K.J., Kim, E.H., Kim, C.J., 2003. Treadmill exercise increases cell proliferation in dentate gyrus of rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Diabetes Complications*. 17, 29-33.
- Kohli, S., Saxena, R., Thomas, E., Rao, P., Verma, I.C., 2005. Prenatal diagnosis of phenylketonuria. *Indian J Med Res*. 122, 400-3.
- Kolker, S., Koeller, D.M., Sauer, S., Horster, F., Schwab, M.A., Hoffmann, G.F., Ullrich, K., Okun, J.G., 2004. Excitotoxicity and bioenergetics in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 27, 805-12.
- Kramer, A.F., Erickson, K.I., Colcombe, S.J., 2006. Exercise, cognition, and the aging brain. *J Appl Physiol* (1985). 101, 1237-42.

- Lee, J.M., Shin, M.S., Ji, E.S., Kim, T.W., Cho, H.S., Kim, C.J., Jang, M.S., Kim, T.W., Kim, B.K., Kim, D.H., 2014. Treadmill exercise improves motor coordination through ameliorating Purkinje cell loss in amyloid beta23-35-induced Alzheimer's disease rats. *J Exerc Rehabil.* 10, 258-64.
- Leite, M., Frizzo, J.K., Nardin, P., de Almeida, L.M., Tramontina, F., Gottfried, C., Goncalves, C.A., 2004. Beta-hydroxy-butyrate alters the extracellular content of S100B in astrocyte cultures. *Brain Res Bull.* 64, 139-43.
- Leite, M.C., Galland, F., Brolese, G., Guerra, M.C., Bortolotto, J.W., Freitas, R., Almeida, L.M., Gottfried, C., Goncalves, C.A., 2008. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods.* 169, 93-9.
- Leloup, C., Allard, C., Carneiro, L., Fioramonti, X., Collins, S., Penicaud, L., 2015. Glucose and hypothalamic astrocytes: More than a fueling role? *Neuroscience.*
- Li, J., Ding, Y.H., Rafols, J.A., Lai, Q., McAllister, J.P., 2nd, Ding, Y., 2005. Increased astrocyte proliferation in rats after running exercise. *Neurosci Lett.* 386, 160-4.
- Limbrick, D.D., Jr., Churn, S.B., Sombati, S., DeLorenzo, R.J., 1995. Inability to restore resting intracellular calcium levels as an early indicator of delayed neuronal cell death. *Brain Res.* 690, 145-56.
- Lindholm, M.E., Rundqvist, H., 2015. Skeletal muscle HIF-1 and exercise. *Exp Physiol.*
- Liu, J., Yeo, H.C., Overvik-Douki, E., Hagen, T., Doniger, S.J., Chyu, D.W., Brooks, G.A., Ames, B.N., 2000. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol (1985).* 89, 21-8.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-75.

- Magistretti, P.J., Pellerin, L., 1999. Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 354, 1155-63.
- Manzano, S., Holzinger, I.B., Kellenberger, C.J., Lacroix, L., Klima-Lange, D., Hersberger, M., La Scala, G., Altermatt, S., Staubli, G., 2015. Diagnostic performance of S100B protein serum measurement in detecting intracranial injury in children with mild head trauma. *Emerg Med J.*
- Martynyuk, A.E., Glushakov, A.V., Sumners, C., Laipis, P.J., Dennis, D.M., Seubert, C.N., 2005. Impaired glutamatergic synaptic transmission in the PKU brain. *Mol Genet Metab.* 86 Suppl 1, S34-42.
- Mazzola, P.N., Moraes, T.B., Pederzolli, C.D., Rosa, A., Zanin, F.R., Coelho, J., Dutra-Filho, C.S., 2012. Acute aerobic exercise restores tryptophan concentration in the brain of rats with hyperphenylalaninemia. *Rev Bras Med Esporte.* 18, 338-340.
- Mazzola, P.N., Bruinenberg, V., Anjema, K., van Vliet, D., Dutra-Filho, C.S., van Spronsen, F.J., van der Zee, E.A., 2015. Voluntary Exercise Prevents Oxidative Stress in the Brain of Phenylketonuria Mice. *JIMD Rep.*
- Mazzola, P.N., Terra, M., Rosa, A.P., Mescka, C.P., Moraes, T.B., Piccoli, B., Jacques, C.E., Dalazen, G., Cortes, M.X., Coelho, J., Dutra-Filho, C.S., 2011. Regular exercise prevents oxidative stress in the brain of hyperphenylalaninemic rats. *Metab Brain Dis.* 26, 291-7.
- Meeusen, R., Thorre, K., Chaouloff, F., Sarre, S., De Meirleir, K., Ebinger, G., Michotte, Y., 1996. Effects of tryptophan and/or acute running on extracellular 5-HT and 5-HIAA levels in the hippocampus of food-deprived rats. *Brain Res.* 740, 245-52.
- Middeldorp, J., Hol, E.M., 2011. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol.* 93, 421-43.

- Milovanovic, D.D., Milovanovic, L., Vranjesevic, D., 1999. Serum tryptophan to large neutral amino acid ratio and urinary tryptophan in three patients with phenylketonuria in a family. A clinical and biochemical study. *Adv Exp Med Biol.* 467, 289-95.
- Minet, R., Villie, F., Marcollet, M., Meynial-Denis, D., Cynober, L., 1997. Measurement of glutamine synthetase activity in rat muscle by a colorimetric assay. *Clin Chim Acta.* 268, 121-32.
- Mirochnic, S., Wolf, S., Staufenbiel, M., Kempermann, G., 2009. Age effects on the regulation of adult hippocampal neurogenesis by physical activity and environmental enrichment in the APP23 mouse model of Alzheimer disease. *Hippocampus.* 19, 1008-18.
- Moraes, T.B., Dalazen, G.R., Jacques, C.E., de Freitas, R.S., Rosa, A.P., Dutra-Filho, C.S., 2014. Glutathione metabolism enzymes in brain and liver of hyperphenylalaninemic rats and the effect of lipoic acid treatment. *Metab Brain Dis.* 29, 609-15.
- Moraes, T.B., Jacques, C.E., Rosa, A.P., Dalazen, G.R., Terra, M., Coelho, J.G., Dutra-Filho, C.S., 2013. Role of catalase and superoxide dismutase activities on oxidative stress in the brain of a phenylketonuria animal model and the effect of lipoic acid. *Cell Mol Neurobiol.* 33, 253-60.
- Netto, C.B., Conte, S., Leite, M.C., Pires, C., Martins, T.L., Vidal, P., Benfato, M.S., Giugliani, R., Goncalves, C.A., 2006. Serum S100B protein is increased in fasting rats. *Arch Med Res.* 37, 683-6.
- Olney, J.W., 1982. The toxic effects of glutamate and related compounds in the retina and the brain. *Retina.* 2, 341-59.

- Paillard, T., 2015. Preventive effects of regular physical exercise against cognitive decline and the risk of dementia with age advancement. *Sports Med Open*. 1, 4.
- Paillard, T., Rolland, Y., de Souto Barreto, P., 2015. Protective Effects of Physical Exercise in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease: A Narrative Review. *J Clin Neurol*. 11, 212-9.
- Pekny, M., Pekna, M., 2004. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol*. 204, 428-37.
- Pekny, M., Wilhelmsson, U., Pekna, M., 2014. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett*. 565, 30-8.
- Pellerin, L., Magistretti, P.J., 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91, 10625-9.
- Pellerin, L., Magistretti, P.J., 2012. Sweet sixteen for ANLS. *J Cereb Blood Flow Metab*. 32, 1152-66.
- Peskind, E.R., Griffin, W.S., Akama, K.T., Raskind, M.A., Van Eldik, L.J., 2001. Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 39, 409-13.
- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*. 83, 346-56.
- Petzold, A., Jenkins, R., Watt, H.C., Green, A.J., Thompson, E.J., Keir, G., Fox, N.C., Rossor, M.N., 2003. Cerebrospinal fluid S100B correlates with brain atrophy in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 336, 167-70.
- Purrucker, J.C., Herrmann, O., Lutsch, J.K., Zorn, M., Schwaninger, M., Bruckner, T., Auffarth, G.U., Veltkamp, R., 2014. Serum protein S100beta is a diagnostic

- biomarker for distinguishing posterior circulation stroke from vertigo of nonvascular causes. *Eur Neurol.* 72, 278-84.
- Radak, Z., Kumagai, S., Taylor, A.W., Naito, H., Goto, S., 2007. Effects of exercise on brain function: role of free radicals. *Appl Physiol Nutr Metab.* 32, 942-6.
- Rodrigues, L., Biasibetti, R., Swarowsky, A., Leite, M.C., Quincozes-Santos, A., Quilfeldt, J.A., Achaval, M., Goncalves, C.A., 2009. Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine. *J Alzheimers Dis.* 17, 193-202.
- Rodrigues, L., Dutra, M.F., Ilha, J., Biasibetti, R., Quincozes-Santos, A., Leite, M.C., Marcuzzo, S., Achaval, M., Goncalves, C.A., 2010. Treadmill training restores spatial cognitive deficits and neurochemical alterations in the hippocampus of rats submitted to an intracerebroventricular administration of streptozotocin. *J Neural Transm.* 117, 1295-305.
- Rossi, D., 2015. Astrocyte physiopathology: At the crossroads of intercellular networking, inflammation and cell death. *Prog Neurobiol.* 130, 86-120.
- Rossi, S., Furlan, R., De Chiara, V., Musella, A., Lo Giudice, T., Mataluni, G., Cavasinni, F., Cantarella, C., Bernardi, G., Muzio, L., Martorana, A., Martino, G., Centonze, D., 2009. Exercise attenuates the clinical, synaptic and dendritic abnormalities of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurobiol Dis.* 36, 51-9.
- Sanayama, Y., Nagasaka, H., Takayanagi, M., Ohura, T., Sakamoto, O., Ito, T., Ishige-Wada, M., Usui, H., Yoshino, M., Ohtake, A., Yorifuji, T., Tsukahara, H., Hirayama, S., Miida, T., Fukui, M., Okano, Y., 2011. Experimental evidence that phenylalanine is strongly associated to oxidative stress in adolescents and adults with phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 103, 220-5.

- Santin, K., da Rocha, R.F., Cechetti, F., Quincozes-Santos, A., de Souza, D.F., Nardin, P., Rodrigues, L., Leite, M.C., Moreira, J.C., Salbego, C.G., Goncalves, C.A., 2011. Moderate exercise training and chronic caloric restriction modulate redox status in rat hippocampus. *Brain Res.* 1421, 1-10.
- Sathe, K., Maetzler, W., Lang, J.D., Mounsey, R.B., Fleckenstein, C., Martin, H.L., Schulte, C., Mustafa, S., Synofzik, M., Vukovic, Z., Itohara, S., Berg, D., Teismann, P., 2012. S100B is increased in Parkinson's disease and ablation protects against MPTP-induced toxicity through the RAGE and TNF-alpha pathway. *Brain.* 135, 3336-47.
- Saur, L., Baptista, P.P., de Senna, P.N., Paim, M.F., do Nascimento, P., Ilha, J., Bagatini, P.B., Achaval, M., Xavier, L.L., 2014. Physical exercise increases GFAP expression and induces morphological changes in hippocampal astrocytes. *Brain Struct Funct.* 219, 293-302.
- Scaccianoce, S., Del Bianco, P., Pannitteri, G., Passarelli, F., 2004. Relationship between stress and circulating levels of S100B protein. *Brain Res.* 1004, 208-11.
- Schober, A.L., Mongin, A.A., 2015. Intracellular levels of glutamate in swollen astrocytes are preserved via neurotransmitter reuptake and de novo synthesis: implications for hyponatremia. *J Neurochem.*
- Schulpis, K.H., Kariyannis, C., Papassotiriou, I., 2004. Serum levels of neural protein S-100B in phenylketonuria. *Clin Biochem.* 37, 76-9.
- Schulpis, K.H., Papassotiriou, I., Tsakiris, S., Vounatsou, M., Chrousos, G.P., 2005. Increased plasma adiponectin concentrations in poorly controlled patients with phenylketonuria normalize with a strict diet: evidence for catecholamine-mediated adiponectin regulation and a complex effect of phenylketonuria diet on atherogenesis risk factors. *Metabolism.* 54, 1350-5.

- Schulpis, K.H., Moukas, M., Parthimos, T., Tsakiris, T., Parthimos, N., Tsakiris, S., 2007. The effect of alpha-Tocopherol supplementation on training-induced elevation of S100B protein in sera of basketball players. *Clin Biochem.* 40, 900-6.
- Schummers, J., Yu, H., Sur, M., 2008. Tuned responses of astrocytes and their influence on hemodynamic signals in the visual cortex. *Science.* 320, 1638-43.
- Smith, A.D., Zigmond, M.J., 2003. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism. *Exp Neurol.* 184, 31-9.
- Soloway, A.H., Soloway, P.D., Warner, V.D., 2013. Possible chemical initiators of cognitive dysfunction in phenylketonuria, Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Med Hypotheses.* 81, 690-4.
- Somani, S.M., Ravi, R., Rybak, L.P., 1995. Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 50, 635-9.
- Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Tubaro, C., Bianchi, R., Giambanco, I., Donato, R., 2013. S100B protein in tissue development, repair and regeneration. *World J Biol Chem.* 4, 1-12.
- Stocchero, C.M., Oses, J.P., Cunha, G.S., Martins, J.B., Brum, L.M., Zimmer, E.R., Souza, D.O., Portela, L.V., Reischak-Oliveira, A., 2014. Serum S100B level increases after running but not cycling exercise. *Appl Physiol Nutr Metab.* 39, 340-4.
- Surtees, R., Blau, N., 2000. The neurochemistry of phenylketonuria. *Eur J Pediatr.* 159 Suppl 2, S109-13.
- Swarowsky, A., Rodrigues, L., Biasibetti, R., Leite, M.C., de Oliveira, L.F., de Almeida, L.M., Gottfried, C., Quillfeldt, J.A., Achaval, M., Goncalves, C.A., 2008. Glial alterations in the hippocampus of rats submitted to ibotenic-induced lesion of the nucleus basalis magnocellularis. *Behav Brain Res.* 190, 206-11.

- Tapia-Rojas, C., Aranguiz, F., Varela-Nallar, L., Inestrosa, N.C., 2015. Voluntary Running Attenuates Memory Loss, Decreases Neuropathological Changes and Induces Neurogenesis in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Brain Pathol.*
- Tarumi, T., Zhang, R., 2015. The Role of Exercise-Induced Cardiovascular Adaptation in Brain Health. *Exerc Sport Sci Rev.* 43, 181-9.
- Taylor, E.H., Hommes, F.A., Stewart, D.E., 1983. Effect of experimental hyperphenylalaninemia on biogenic amine synthesis at later stages of brain development. *Biochem Med.* 29, 307-17.
- Thomazi, A.P., Godinho, G.F., Rodrigues, J.M., Schwalm, F.D., Frizzo, M.E., Moriguchi, E., Souza, D.O., Wofchuk, S.T., 2004. Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. *Mech Ageing Dev.* 125, 475-81.
- Thomsen, L.B., Burkhart, A., Moos, T., 2015. A Triple Culture Model of the Blood-Brain Barrier Using Porcine Brain Endothelial cells, Astrocytes and Pericytes. *PLoS One.* 10, e0134765.
- Tramontina, A.C., Tramontina, F., Bobermin, L.D., Zanotto, C., Souza, D.F., Leite, M.C., Nardin, P., Gottfried, C., Goncalves, C.A., 2008. Secretion of S100B, an astrocyte-derived neurotrophic protein, is stimulated by fluoxetine via a mechanism independent of serotonin. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 32, 1580-3.
- Tramontina, F., Leite, M.C., Goncalves, D., Tramontina, A.C., Souza, D.F., Frizzo, J.K., Nardin, P., Gottfried, C., Wofchuk, S.T., Goncalves, C.A., 2006. High glutamate decreases S100B secretion by a mechanism dependent on the glutamate transporter. *Neurochem Res.* 31, 815-20.

- Tramontina, F., Leite, M.C., Cereser, K., de Souza, D.F., Tramontina, A.C., Nardin, P., Andrezza, A.C., Gottfried, C., Kapczinski, F., Goncalves, C.A., 2007. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J Neurosci Methods*. 162, 282-6.
- Uda, M., Ishido, M., Kami, K., Masuhara, M., 2006. Effects of chronic treadmill running on neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus of adult rat. *Brain Res*. 1104, 64-72.
- Ushakova, G.A., Gubkina, H.A., Kachur, V.A., Lepekhin, E.A., 1997. Effect of experimental hyperphenylalaninemia on the postnatal rat brain. *Int J Dev Neurosci*. 15, 29-36.
- Van Eldik, L.J., Wainwright, M.S., 2003. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci*. 21, 97-108.
- Van Laar, V.S., Roy, N., Liu, A., Rajprohat, S., Arnold, B., Dukes, A.A., Holbein, C.D., Berman, S.B., 2015. Glutamate excitotoxicity in neurons triggers mitochondrial and endoplasmic reticulum accumulation of Parkin, and, in the presence of N-acetyl cysteine, mitophagy. *Neurobiol Dis*. 74, 180-93.
- van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H., 1999a. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*. 2, 266-70.
- van Praag, H., Christie, B.R., Sejnowski, T.J., Gage, F.H., 1999b. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96, 13427-31.
- van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., Gage, F.H., 2005. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci*. 25, 8680-5.

- Vicente, E., Boer, M., Leite, M., Silva, M., Tramontina, F., Porciuncula, L., Dalmaz, C., Goncalves, C.A., 2004. Cerebrospinal fluid S100B increases reversibly in neonates of methyl mercury-intoxicated pregnant rats. *Neurotoxicology*. 25, 771-7.
- Wang, D.D., Bordey, A., 2008. The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol*. 86, 342-67.
- Wang, X., Zhang, M., Feng, R., Li, W.B., Ren, S.Q., Zhang, J., Zhang, F., 2014. Physical exercise training and neurovascular unit in ischemic stroke. *Neuroscience*. 271, 99-107.
- Widaman, K.F., 2009. Phenylketonuria in Children and Mothers: Genes, Environments, Behavior. *Curr Dir Psychol Sci*. 18, 48.
- Yamamoto, H., Konno, H., Yamamoto, T., Ito, K., Mizugaki, M., Iwasaki, Y., 1987. Glutamine synthetase of the human brain: purification and characterization. *J Neurochem*. 49, 603-9.
- Zadori, D., Veres, G., Szalardy, L., Klivenyi, P., Toldi, J., Vecsei, L., 2014. Glutamatergic dysfunctioning in Alzheimer's disease and related therapeutic targets. *J Alzheimers Dis*. 42 Suppl 3, S177-87.
- Zhang, H., Gu, X.F., 2005. A study of gene expression profiles of cultured embryonic rat neurons induced by phenylalanine. *Metab Brain Dis*. 20, 61-72.
- Zhou, G., Gan, Y., Miao, M., Hamilton, K., Knoll, N., Schwarzer, R., 2015. The role of action control and action planning on fruit and vegetable consumption. *Appetite*. 91, 64-8.
- Zumkehr, J., Rodriguez-Ortiz, C.J., Cheng, D., Kieu, Z., Wai, T., Hawkins, C., Kilian, J., Lim, S.L., Medeiros, R., Kitazawa, M., 2015. Ceftriaxone ameliorates tau pathology and cognitive decline via restoration of glial glutamate transporter in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 36, 2260-71.