

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Instituto de Biociências**

**Departamento de Bioquímica**

**ESTUDO DO SISTEMA BETA-ENDORFÍNICO EM UM  
MODELO ANIMAL DE FENILCETONÚRIA**

**ANE ROSE BOLNER**

**Orientador**

**PROF. DR. CLÓVIS MILTON DUVAL WANNMACHER**

*Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas - Bioquímica do Instituto de Biociências da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do grau de Mestre em  
Bioquímica.*

**Porto Alegre**

**1993**

*Dedico este trabalho a meu esposo Daniel, pela preciosa contribuição intelectual; a meus pais, irmãos e familiares, pelo apoio nas horas difíceis; em especial, às queridas monitoras e amigas Alicia Facca e Juliana Engelmann, sem as quais não seria possível a conclusão deste trabalho.*

## *AGRADECIMENTOS*

*Agradeço a meu esposo, pais, irmãos e familiares por seu apoio nas horas difíceis; ao Orientador Prof. Dr. Clóvis Milton Duval Wannmacher e sua esposa Prof. Dra. Lenita Wannmacher, pela atenção e amizade; aos colegas, professores e funcionários do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por seu prestimoso auxílio e colaboração; e ao CNPQ , FINEP e FAPERGS pelo suporte financeiro.*

*A voz do intelecto é suave, mas não descansa até encontrar um ouvinte.*

Sigmund Freud

## ABREVIATURAS

- ACTH** - hormônio adrenocorticotrópico  
**ADP** - adenosina 5'-difosfato  
**ALA** - alanina  
**AMP** - adenosina 5'-monofosfato  
**AMPe** - adenosina 3', 5'- monofosfato cíclico  
**ATP** - adenosina 5'-trifosfato  
**βE** - beta-endorfina  
**iβE** - imunorreatividade tipo beta-endorfina  
**BH<sub>4</sub>** - tetraidrobiopterina  
**BHE** - barreira hemato-encefálica  
**cols.** - colaboradores  
**CIPhe** - paraclorofenilalanina  
**DP** - desvio-padrão  
**DNA** - ácido desoxirribonucleico  
**ECT** - eletroconvulsoterapia  
**EIM** - erros inatos do metabolismo  
**IP** - intraperitoneal  
**IV** - intravenoso  
**LCR** - líquido cefalorraquidiano  
**LDH** - desidrogenase láctica  
**mePhe** - alfa-metilfenilalanina  
**NAD** - nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)  
**NADH** - nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)  
**NADP** - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)  
**NADPH** - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)  
**PA** - fenilacetato  
**PAH** - fenilalanina hidroxilase  
**Phe** - fenilalanina  
**PKU** - fenilcetonúria  
**RIA** - radioimunoensaio  
**SAL** - solução salina  
**SNA** - sistema nervoso autônomo  
**SNC** - sistema nervoso central  
**TRP** - triptofano  
**TYR** - tirosina

## RESUMO

A fenilcetonúria (PKU) é um erro inato do metabolismo devido à diminuição da atividade da fenilalanina hidroxilase no fígado, levando ao acúmulo de fenilalanina e seus metabólitos no sangue, líquido e tecidos. Em seres humanos é caracterizada, entre outros sintomas, por retardo mental.

Neste trabalho, são estudadas as alterações no sistema beta-endorfinico de ratos submetidos à fenilcetonúria experimental, através de testes comportamentais e da determinação de imunorreatividade tipo beta-endorfina em hipotálamo, com e sem exposição à novidade.

Conclui-se que o modelo experimental de PKU em ratos apresenta déficit de aprendizado/memória, aferido através do número de respostas de orientação na habituação em campo aberto. Não há diferença na atividade motora entre os grupos.

Nestes animais, o déficit de aprendizado/memória foi acompanhado de uma ausência de resposta à novidade, aferida pela redução dos níveis de imunorreatividade tipo beta-endorfina no hipotálamo, a qual foi observada nos controles.

Além disso, não se verificou a redução esperada no número de respostas de orientação, do treino para o teste. Esta situação foi revertida nos ratos do grupo experimental de PKU que receberam beta-endorfina murina imediatamente após o treino.

Os resultados sugerem que o modelo experimental de PKU pode produzir alterações no sistema beta-endorfinico, as quais ocorrem em paralelo com o déficit de aprendizado/memória e são parcialmente revertidas com a administração de beta-endorfina murina.

# SUMÁRIO

	<i>página</i>
<b>INTRODUÇÃO</b>	1
<b>1. ERROS INATOS DO METABOLISMO</b>	1
1.1. Conceito	1
1.2. Fenilcetonúria	3
1.2.1. Definição, aspectos clínicos e tratamento	3
1.2.2. PKU e retardo mental	11
1.3. Modelos experimentais de fenilcetonúria	22
1.4. Opióides endógenos e sua relação com o aprendizado e memória	25
1.4.1. Opióides endógenos em seres humanos; aplicação clínica	25
1.4.2. Opióides endógenos versus aprendizado/memória	31
<b>2. OBJETIVOS</b>	38
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	39
3.1.a. Animais experimentais (primeiro grupo)	39
3.1.b. Tratamento farmacológico	40
3.1.c. Estímulo comportamental	41
3.1.d. Dosagem de imunorreatividade tipo beta-endorfina	42
3.2.a. Animais experimentais (segundo grupo)	44
3.2.b. Tratamento farmacológico	45
3.2.c. Avaliação comportamental	47
3.3. Análise estatística	48

<b>4 . RESULTADOS</b>	<b>49</b>
4.1. Primeiro grupo experimental : determinação da imunorreatividade tipo beta-endorfina no modelo experimental de PKU e resposta à novidade	49
4.2. Segundo grupo experimental : comparação dos testes de comportamento entre os animais hiperfenilalaninêmicos e controles; análise da resposta à injeção intraperitoneal de beta-endorfina murina	57
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>66</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>74</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>76</b>

# INTRODUÇÃO

## 1. ERROS INATOS DO METABOLISMO

### 1.1. CONCEITO

Denomina-se erros inatos do metabolismo (EIM) a um grupo de doenças geneticamente herdadas, caracterizadas pela ausência ou alteração de uma determinada proteína, geralmente uma enzima, produzindo a sintomatologia característica. O primeiro erro inato do metabolismo descoberto foi a cistinúria, descrita por Wollaston, em 1810. No início do século, *Sir* Archibald Garrod descreveu outras três doenças - alcaptonúria, albinismo e pentosúria - formulando em 1908 o conceito de EIM e sugerindo como causa a alteração de uma enzima, levando ao acúmulo ou à falta de substâncias (Scriver et al., 1989; Bickel, 1987).

Este conceito foi modificado na década de 40; entretanto, acreditava-se que a cada alteração enzimática correspondia um gene. Atualmente, sabe-se que existem doenças de herança poligênica e genes de expressão variável, produzindo ou não sintomas de acordo com as características individuais (Scriver et al., 1989).

Embora raros individualmente, os EIM como um grupo são relativamente comuns entre as causas de morte súbita ou acidose intratável em pacientes pediátricos, adquirindo maior importância em vista da necessidade de prevenção e orientação às famílias, avaliação genética e manejo sintomático (Davidson , 1992).

Os EIM mais frequentes, com base em estatísticas européias, são a fibrose cística e, em segundo lugar, a fenilcetonúria. Nos EUA, os distúrbios neurometabólicos mais comuns são as acidúrias orgânicas e aminoacidopatias, seguidas pelos distúrbios do ciclo da uréia (Bickel, 1987; Chaves, 1992).

Muitas destas doenças apresentam-se clinicamente com retardo no desenvolvimento neuro-psicomotor, alteração na motricidade e deficiência de aprendizagem, levando ao retardo mental. As alterações neurológicas podem se acompanhar de acidose e distúrbios hidroeletrólíticos. Sendo assim, muitos esforços têm sido dedicados à pesquisa das alterações subseqüentes ao defeito genético básico, numa tentativa de prevenir ou atenuar a sintomatologia clínica decorrente do mesmo (Scriver et al., 1989; Bickel, 1987; Wyngaarden et al., 1988).

Nesse aspecto, a fenilcetonúria destaca-se por apresentar uma abordagem terapêutica, com base em uma dieta pobre em fenilalanina, que permite melhorar o prognóstico dos pacientes em relação ao desenvolvimento neuro-psicomotor (Scriver et al., 1989; Bickel, 1987; Wyngaarden et al., 1988).

Por esta razão, o grupo de pesquisadores ao qual estamos filiados vem realizando, desde a década de 70, estudos sobre a fenilcetonúria em nosso meio (Giugliani et al., 1989).

## 1.2. FENILCETONÚRIA

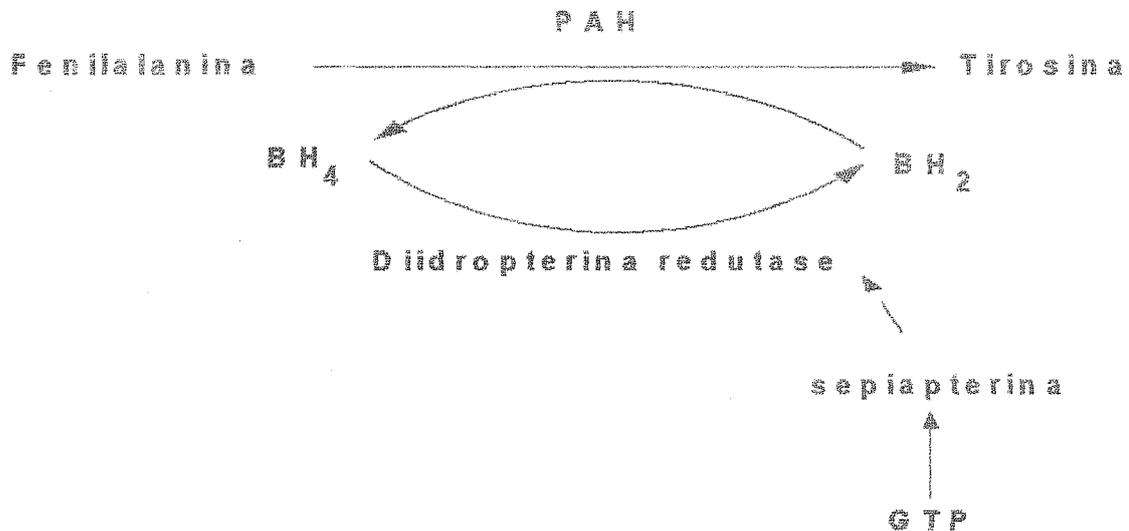
### 1.2.1. Definição, aspectos clínicos e tratamento

A fenilcetonúria (PKU) foi um dos primeiros EIM a ser relacionado à doença mental; é também a aminoacidopatia mais estudada. Foi descoberta por Følling, em 1934, através da realização do teste do cloreto férrico (citado por Scriver et al., 1989).

A PKU apresenta um fenótipo caracterizado por níveis plasmáticos persistentemente elevados de fenilalanina (Phe), um aminoácido neutro essencial. A Phe é hidroxilada pela fenilalanina hidroxilase (PAH), formando tirosina; esta reação requer a presença de Phe, oxigênio, PAH e o cofator tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>). No cérebro, não existe PAH, e sim uma enzima denominada tirosina hidroxilase, a qual catalisa a conversão de Phe em tirosina na mesma velocidade em que hidroxila a tirosina. O papel desta enzima na PKU não está esclarecido (Scriver et al., 1989; Bickel, 1987; Wyngaarden et al., 1988).

A reação intra-hepática de hidroxilação da fenilalanina em tirosina está representada na Figura 1, adaptada de Bickel, 1987. As principais rotas metabólicas da fenilalanina estão sumarizadas na Figura 2, adaptada de Scriver et al., 1989.

As causas de hiperfenilalaninemia envolvem mutações no locus que codifica a enzima PAH, nos loci responsáveis pela síntese do cofator BH<sub>4</sub> e no locus da diidropteridina redutase, enzima que regenera o BH<sub>4</sub>. Conforme Scriver et al., 1989, acredita-se que a PKU deve-se especificamente a mutações no locus codificador da PAH.



**Figura 1. Hidroxilação da fenilalanina em tirosina.**

BH<sub>4</sub> = tetraidrobiopterina (cofator). BH<sub>2</sub> = diidrobiopterina (cofator). GTP = guanina trifosfato. PAH = fenilalanina hidroxilase (enzima conversora).

Adaptado de BICKEL, H. - Early Diagnosis and Treatment of Inborn Errors of Metabolism. *Enzyme* 38: 14-26, 1987.

**L- Fenilalanina  $\rightarrow$  Feniletilamina**

**L-Fenilalanina  $\rightarrow$  L-Tirosina  $\rightarrow$  *p*-OHfenilpiruvato  $\xrightarrow{\text{-----}}$  Fumarato  
 $\xrightarrow{\text{-----}}$  Acetoacetato**

**L- Fenilalanina  $\leftrightarrow$  Fenilpiruvato  $\rightarrow$  Fenil-lactato**

**$\rightarrow$  Fenilacetato**

**$\rightarrow$  *o*-OHfenilacetato**

**Figura 2. Principais rotas metabólicas da fenilalanina.**

Adaptado de SCRIVER, C.R. et al. (editores)- The Metabolic Basis of Inherited Disease. McGraw-Hill, New York, 6a. edição, Capítulo 15, pág. 499, 1989.

A PKU é descrita clinicamente como autossômica recessiva; a homozigose produz uma deficiência severa da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH). A heterozigose permite que a enzima mantenha atividade parcial, produzindo concentrações plasmáticas normais de Phe na maioria das circunstâncias (Wyngaarden et al., 1988).

A correlação entre o fenótipo e atividade residual da PAH foi recentemente estudada por Okano et al., em 1991, analisando uma série de mutações no gene que codifica a PAH e a tolerância à fenilalanina na dieta, bem como o nível sérico de fenilalanina antes do tratamento.

A atividade da PAH foi determinada *in vitro* e verificada em pacientes homo e heterozigotos, através de medidas de fluxo com técnicas isotópicas. Nos indivíduos em que a enzima apresentava menor atividade, isto é, era um fator limitante da velocidade do metabolismo da Phe, foi demonstrada uma boa correlação entre os valores calculados e os observados *in vivo* (Okano et al., 1991).

No Brasil, não existem estatísticas sistemáticas; entretanto, resultados preliminares de um estudo realizado por Giugliani et al., em 1992, indicam uma frequência da PKU de 1:14.288 nascimentos vivos, detectada através de triagem neonatal.

Segundo Scriver, em 1987, a frequência da PKU na Europa era de 12 casos para 100.000 nascidos vivos (correspondendo a um caso para cada 8.300 nascimentos) (citado por Bickel, 1987).

Estudos de triagem neonatal realizados de 1969 a 1984 em Heidelberg, Alemanha, mostraram que a frequência de casos de hiperfenilalaninemia em geral (incluindo PKU), foi de 1:5.530 nascimentos, sendo que a frequência da hiperfenilalaninemia não-PKU foi de 1:12.000 nascimentos e a frequência isolada de PKU, 1:10.000

nascimentos (Bickel, 1987).

Um banco de dados europeu apresentou estatística similar: considerando os nascimentos até 1980, a frequência da hiperfenilalaninemia em geral foi de 1:10.500 nascimentos. No Japão, a ocorrência da PKU parece ser 10 vezes menor: uma triagem realizada no período de 1977 a 1985 revelou uma incidência de 1:119.300 nascimentos (Bickel, 1987).

Na Arábia Saudita, em 1992, Ozand observou uma alta incidência de aminoacidopatias e outros EIM, provavelmente devido ao alto índice de casamentos consangüíneos na região. De um grupo de 910 crianças encaminhadas ao centro de referência King Faisal Specialist Hospital, foram realizados diagnósticos etiológicos em 473 pacientes, dos quais 14% apresentavam distúrbios no metabolismo dos aminoácidos. Nestes, a PKU clássica foi um achado raro (16% das aminoacidemias), mas a hiperfenilalaninemia por deficiência de 6-piruvil-tetraidropterina sintase (6PTSD) apresentou uma incidência de 19% dentro das aminoacidemias, superada somente pela acidemia de cadeias ramificadas (44%).

Os pacientes com PKU não apresentam sintomas intra-uterinos, devido à atividade enzimática materna normal. Se não tratados, porém, desenvolvem gradualmente após o nascimento retardo mental, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, hiperatividade, convulsões e alterações cutâneas (eczema e distúrbios da pigmentação). Em alguns pacientes, a urina pode apresentar odor fétido, semelhante à urina de rato, devido à presença do ácido fenilacético (Wyngaarden et al, 1988).

As necessidades diárias de fenilalanina em seres humanos variam de 200 a 500 mg/dia. O lactente requer de 25 a 90 mg/kg/dia; a criança

em idade pré-escolar necessita cerca de 70 mg/kg/dia; as necessidades vão sendo reduzidas com o passar dos anos, e o adulto jovem necessita apenas cerca de 14 mg/kg/dia de Phe (Scriver et al., 1989).

A hiperfenilalaninemia é caracterizada por níveis plasmáticos acima de 0,12 mM, ou 0,20 mg/ml. Na PKU clássica, usualmente os níveis encontram-se acima de 0,16 mg/ml, e a tolerância à fenilalanina na dieta situa-se entre 250-500 mg/dia (Scriver et al., 1989; Wyngaarden et al., 1988).

A atividade residual da PAH influencia o prognóstico e tratamento: pacientes com atividade residual mínima menor que 1% necessitam dieta estrita, enquanto pacientes com atividade residual acima de 5% do normal não necessitam de dieta, apresentando apenas hiperfenilalaninemia moderada (Trefz et al., 1985, citado por Bickel, 1987; Barranger et al., 1972).

As técnicas usuais para detecção de PKU envolvem o teste de Guthrie (em nosso meio conhecido como "teste do pezinho"), cromatografia em sangue ou urina e dosagem quantitativa de fenilalanina por fluorimetria. O manejo dietético da PKU foi proposto inicialmente por Bickel, em 1953 (Scriver et al., 1989; Bickel, 1987; Wyngaarden et al., 1988; Realmuto et al., 1986).

A base do tratamento fundamenta-se na restrição dietética de 250-500 mg de Phe por dia, através de produtos semi-sintéticos especiais, e no acompanhamento seriado dos níveis plasmáticos de Phe, que devem manter-se entre 3 a 12 mg / dl (Wyngaarden et al., 1988; Realmuto et al., 1986).

O início do tratamento deve ser o mais precoce possível após o nascimento, uma vez que a instituição de terapia num período tardio leva a uma menor recuperação da capacidade cognitiva (Hommes, 1991).

Usualmente, a dieta é interrompida na puberdade, quando o cérebro está desenvolvido o suficiente para tolerar níveis plasmáticos de Phe entre 15 e 20 mg / dl. Entretanto, o feto de gestante portadora de PKU poderá apresentar, com estes níveis, vários tipos de manifestações severas. A única forma conhecida de evitar este quadro é reintroduzir a dieta pobre em Phe antes da concepção e segui-la rigidamente durante a gravidez (Bickel, 1987; Wyngaarden et al., 1988).

Além disso, alguns autores observaram sintomas mentais (diminuição da vigilância e redução da síntese de neurotransmissores cerebrais) após a suspensão da dieta pobre em Phe em pacientes adolescentes (Hommes, 1989; Lou et al., 1985; Lou et al., 1987), efeito este revertido após a utilização de grandes doses de tirosina ou retomada da restrição de Phe na dieta (Lou et al., 1987).

Elsas & Trotter, em 1988 (citados por Hommes, em 1989), demonstraram que um aumento na concentração plasmática de Phe da ordem de 0,5 mM em pacientes com PKU produz uma lentificação da frequência das ondas alfa no eletroencefalograma, bem como uma redução na concentração plasmática de L-DOPA.

Vários pesquisadores observaram que, em pacientes adultos, a suspensão da dieta pobre em Phe pode provocar desmielinização, verificada através da alteração dos potenciais evocados de resposta visual (Creel et al., 1982; Londi et al., 1987; Giovannini et al., 1988 [citados por Hommes, 1991]) e das imagens cerebrais por ressonância

nuclear magnética (Villasani et al., 1989 [citado por Hommes, 1991]; Pearsen et al., 1990; Thompson et al., 1990).

Ainda não se sabe a extensão da desmielinização, sua velocidade de progressão e a repercussão clínica deste fenômeno sobre o tratamento de pacientes com PKU. Aparentemente, é reversível com a retomada da dieta (Hommes, 1991; Thompson et al., 1990).

Bach et al., em 1991, relatou que a fenilalanina, conforme estudos prévios do autor, produz como efeito secundário uma analgesia reversível com naloxone, demonstrada em animais experimentais e também em seres humanos (por exemplo, eficaz na dor aguda da extração dentária, porém ineficaz na dor lombar crônica e na dor de origem isquêmica produzida por um garrote).

O prognóstico dos pacientes tratados precocemente é bom, embora possa haver dificuldade em atingir um desenvolvimento intelectual pleno em alguns casos. Entretanto, alguns autores relatam uma série de distúrbios psiquiátricos e comportamentais, observados mesmo em crianças tratadas precocemente (Realmuto et al., 1986).

Realmuto et al., em 1986, realizou um estudo com 13 crianças fenilcetonúricas diagnosticadas e tratadas logo após o nascimento, que apresentavam QI normal. Destas, seis apresentavam distúrbios psiquiátricos (distúrbio de déficit de atenção) e duas apresentavam sintomas depressivos, sem preencher os critérios clínicos de transtorno afetivo maior. Outros seis pacientes haviam apresentado, em sua história progressa, episódios que satisfaziam os critérios para distúrbio de déficit de atenção. Segundo o autor, é possível que o tratamento dietético isolado não previna os sintomas psiquiátricos.

O futuro das terapias para a PKU e outros EIM centra-se nos

progressos da tecnologia do DNA recombinante e transferência genética. A experiência dos últimos 10 anos com transplantes de medula óssea de doadores normais compatíveis para várias doenças neoplásicas avanta a possibilidade de seu uso em doenças geneticamente herdadas, numa tentativa de evitar a lesão cerebral irreparável (Ozand & Gascon, 1992).

A terapia genética somática envolverá a transferência de genes normais a células somáticas, o que já vem sendo realizado em culturas de células e animais experimentais (Ledley, 1990). As instituições de pesquisa prevêem para daqui a aproximadamente 10 anos o uso extensivo de transplantes de medula óssea como alternativa para transferir componentes das células do doador para o hospedeiro, oferecendo uma alternativa terapêutica para cerca de 40 EIM atualmente de evolução grave ou fatal (Hobbs, 1990).

### 1.2.2. PKU e retardo mental

A razão pela qual a elevação da concentração plasmática de Phe conduz ao retardo mental ainda está sob discussão (Scriver et al., 1989). Segundo Pardridge, o  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) dos aminoácidos neutros na barreira hemato-encefálica é muito semelhante à sua concentração plasmática, o que propicia a competição entre eles por sistemas de transporte e sítios de ligação. O  $K_m$  da Phe na barreira hemato-encefálica é cerca de 0,12 mM, e seus níveis plasmáticos médios são de 0,05 mM. Nos tecidos extra-cerebrais, o  $K_m$  dos aminoácidos neutros situa-se entre 5 e 10 mM, o que corresponde a 10-100 vezes sua concentração plasmática fisiológica. Assim, nestes tecidos não ocorre competição (Pardridge et al., 1977, citado por Cockburn & Gitzelmann, 1982).

Por esta razão, o sistema nervoso central (SNC) apresenta maior sensibilidade à incidência de efeitos colaterais deletérios nas aminoacidopatias deste grupo (Cockburn & Gitzelmann, 1982).

Além disso, dentre os aminoácidos neutros, a Phe apresenta a maior afinidade pelo sistema de transporte da barreira hematoencefálica, provocando um grande acúmulo da mesma no SNC. Existem dois tipos de mecanismos de transporte dos aminoácidos neutros através da barreira hemato-encefálica: saturável e não-saturável. A cinética dos aminoácidos neutros no cérebro de rato foi determinada por Pardridge, em 1983 (citado por Hommes, 1989).

Experimentos mais recentes demonstraram que a cinética nos microvasos cerebrais humanos é muito semelhante à dos estudos *in vivo* em ratos (Pardridge & Choi, 1986, citados por Hommes, em 1989).

Assim, é provável que os mecanismos de captação da fenilalanina estejam sujeitos à mesma regulação nos seres humanos e no rato (Hommes, 1989).

A competição entre a Phe e outros aminoácidos pelo mesmo transportador levou alguns autores a propor, somado à redução na ingestão de Phe, a inclusão de um suplemento de tirosina e triptofânio na dieta (Baños et al., 1977; Berry et al., 1982 e 1985; Pratt, 1980 e 1981 [citados por Hommes, 1989]; Lou, 1985). Segundo eles, a competição pelos mecanismos de transporte poderia ser superada, oferecendo-se uma margem de segurança maior a variações na concentração plasmática de Phe.

Outros autores, como Huether, em 1989, observaram que, em ratos, a depleção de outros aminoácidos pode ser revertida também com uma injeção de lisina, mesmo sob concentrações aumentadas de Phe.

Um estudo realizado por Ratzman et al., em 1984, avaliando a relação entre as concentrações de Phe e tirosina no plasma e líquor de 6 pacientes com PKU e 17 controles normais, encontrou uma concentração de Phe no plasma e líquor respectivamente 6,4 e 4,6 vezes maior nos pacientes com PKU, mas a relação plasma/líquor manteve-se inalterada. Surpreendentemente, a relação plasma / líquor da tirosina foi significativamente menor na PKU, isto é, havia uma quantidade significativamente maior de tirosina no líquor.

Não se justificando este achado pela competição no transporte, o autor acredita que o aumento de tirosina líquórica possa refletir um metabolismo celular anômalo no SNC. Seria de se esperar um aumento na síntese protéica associado ao aumento dos aminoácidos livres no líquor. Entretanto, a elevação da Phe cerebral inibe diretamente a

síntese proteica (Agrawal, et al., 1970; Geison, et al., 1975, e Oja, 1972 [citados por Ratzmann et al., em 1984]; Hughes et al., 1976 [citado por Huether, 1989]). O aumento da concentração cerebral de Phe também inibe a hidroxilação do triptofânio e tirosina (Ratzmann et al., 1984; McChesney et al., 1988).

O aumento da concentração de Phe no SNC provoca uma deficiência de catecolaminas cerebrais (especialmente a dopamina), mesmo se a concentração cerebral do precursor tirosina for igual ou maior que o normal. Isto é, o grau de interferência na função cerebral normal depende da magnitude do aumento na concentração *cerebral* de Phe, e não somente da concentração plasmática (Brass et al., 1982, citado por McChesney. et al., 1988).

O efeito da Phe sobre a concentração cerebral de triptofânio tem reflexos sobre um importante derivado metabólico do mesmo, a serotonina. Alterações relativamente leves na concentração de triptofânio produzem um déficit de serotonina, a qual é um modulador importante das funções do SNC, bem como um sinalizador para eventos morfogênicos da embriogênese cerebral. Alterações na disponibilidade de serotonina podem levar a deficiências de caráter permanente no desenvolvimento cerebral (Huether, 1989).

Perry, em 1962, estudou um grupo de crianças fenilcetonúricas, observando que as mesmas excretavam significativamente menos serotonina e triptamina urinárias que os controles normais. As crianças com síndrome de Down e aquelas com retardo mental de outras causas apresentaram excreção urinária de serotonina e triptamina idêntica aos controles.

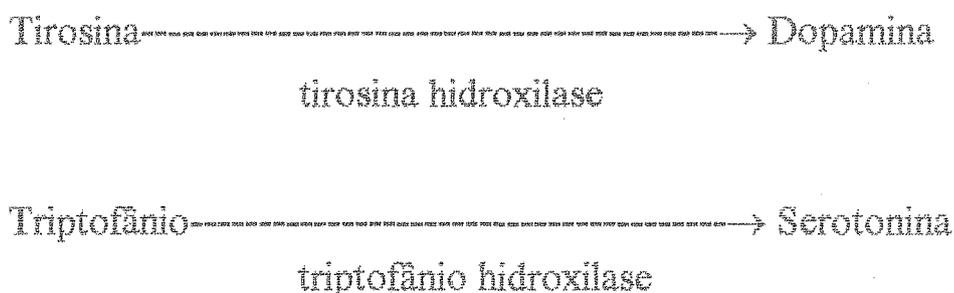
Além disso, a histidina e tirosina utilizam o mesmo transportador

através da barreira hemato-encefálica, mas a histidinemia e tirosinemia tipo II não estão associadas ao grau de retardo mental observado na PKU, ainda que alterem a serotonina de forma semelhante à observada na PKU. Mesmo em presença de concentrações séricas de Phe equivalentes às da PKU não tratada, estes EIM não provocam disfunção cerebral (Hommes, 1991).

Assim, provavelmente o retardo do desenvolvimento neuropsicomotor apresentado pelas crianças fenilcetonúricas não se deve apenas à alteração do metabolismo destes neurotransmissores.

Segundo Hommes (1991), é pouco provável que estas alterações sejam, isoladamente, responsáveis pelo retardo mental na PKU, embora comprovadamente causem modificações no afeto, respostas comportamentais e neuropsicológicas de certos pacientes (Lou et al., 1985 e 1987; Ozand, 1992; Krause et al., 1986).

A Figura 3 mostra dois importantes neurotransmissores alterados pela hiperfenilalaninemia e seus precursores.



**Figura 3. Alterações de neurotransmissores na hiperfenilalaninemia**

O desenvolvimento dos receptores de neurotransmissores cerebrais também foi estudado. Observou-se que, na hiperfenilalaninemia crônica produzida em ratos, existe um decréscimo no número de sítios de ligação nos receptores colinérgicos muscarínicos, receptores do GABA e receptores serotoninérgicos tipo 1 e tipo 2. Com exceção do receptor serotoninérgico tipo 1, os demais apresentam uma recuperação após a suspensão da Phe. Em seres humanos, foi demonstrado que a hiperfenilalaninemia leva a uma redução do número de sinapses (Hommes, 1991).

A inibição da síntese protéica cerebral causada pela Phe possui vários aspectos notáveis. Vários autores (Aoki et al., 1970; Siegel et al., 1971; McInnes et al., 1971; Taub et al., 1975 [citados por Hughes et al., 1977]; Roberts et al., 1976 [citado por Loo et al., 1980]) descreveram uma desagregação de polirribossomos, aumentando a concentração cerebral de monorribossomos 80S, os quais não estão ligados ao mRNA ou tRNA. Os trabalhos iniciais sugeriam que este aumento seria devido a um aumento da atividade da RNase.

Entretanto, o trabalho de Hughes & Johnson, 1977, excluiu esta possibilidade, mostrando que a atividade da RNase permanecia em níveis normais. Estes autores sugeriram que o mecanismo de transporte de aminoácidos alterado, levando a um distúrbio da inicialização do processo de formação de polirribossomos, seria o principal responsável.

Neste estudo, também foi verificado que a administração aguda de fenilalanina leva a uma redução de 10% na acilação do tRNA, afetando a síntese proteica cerebral. A suplementação com aminoácidos reverte este efeito.

Em ratos, observou-se que as proteínas mais complexas (como as

congêneres da mielina) são mais afetadas que as simples (Hommes, 1985 [citado por Hommes, 1991]). Verificou-se também que a fenilalanina, tanto em concentrações elevadas quanto em níveis quase "fisiológicos", inibe a enzima ATP-sulfurilase cerebral, um efeito observado em associação a um decréscimo na concentração central de mielina

A ATP-sulfurilase é mais ativa nas áreas do cérebro que parecem ser mais lesadas na PKU. Sua atividade é paralela à velocidade de mielinização cerebral (Hommes, 1990 [citado por Hommes, 1991]).

Chase et al., em 1970, demonstrou a redução da incorporação cerebral de sulfato na PKU, a qual também acompanha a mielinização.

Hommes, em 1991, também demonstrou um aumento da sensibilidade da mielina e proteínas derivadas da mesma à proteólise, em ratos hiperfenilalaninêmicos. Segundo ele, a redução dos sulfatídeos na estrutura básica da mielina, provocada pelo excesso de Phe, poderia ser responsável pela maior suscetibilidade da mielina e derivados à degradação. Entretanto, o mesmo autor lembra que, na leucodistrofia metacromática, onde ocorre um acúmulo de sulfatídeos devido à deficiência da enzima sulfatase, também ocorre desmielinização.

O surgimento de uma variedade de ratos mutantes com deficiência de PAH (McDonald et al., 1990, citado por Hommes, 1991), permitiu a reprodução de estudos anteriormente realizados com inibidores da PAH, a fim de verificar o efeito da hiperfenilalaninemia *per se*. A degradação aumentada de mielina também foi observada nesses ratos, indicando ser um efeito não dos inibidores e sim da própria Phe.

Além disso, uma série de autores verificaram que, mesmo em pacientes adultos, a suspensão da dieta pobre em Phe pode provocar

desmielinização, verificada indiretamente através da alteração dos potenciais evocados de resposta visual ( Creel et al., 1982; Londi et al., 1987; Giovannini et al., 1988 [citados por Hommes, 1991]) e diretamente através das imagens cerebrais obtidas pela ressonância nuclear magnética (Villasani et al., 1989 e Pearsen et al., 1990 [citados por Hommes, em 1991]; Thompson et al., 1990). Este efeito é reversível após a retomada da dieta específica.

Outra linha de investigação que tem despertado interesse abrange o estudo dos metabólitos da fenilalanina, principalmente o fenilpiruvato, fenilacetato e fenilactato. O estudo *in vitro* de tecido cerebral e hepático de rato, incubado com estes três metabólitos, mostrou que todos inibem a síntese do colesterol a partir do ácido mevalônico em ambos os tecidos (Shah et al., 1969).

Em cultura de neurônios do córtex cerebral de camundongos, Swaiman & Wu, em 1984, encontraram uma redução no número de neurônios em meios com Phe ou fenilacetato; encontraram também uma queda na atividade da colina acetiltransferase (indicando indiretamente uma redução na população de neurônios colinérgicos) bem como uma redução na atividade da descarboxilase do ácido glutâmico (correspondente a uma redução na população de neurônios GABAérgicos).

Fulton et al., em 1980, expôs ratos aos principais metabólitos da Phe (ver Figura 2) : fenilacetato, fenilpiruvato, fenilactato e mandelato. Somente os ratos tratados com fenilacetato apresentaram-se hipotativos na habituação ao campo aberto e baixa performance no labirinto e esquiva ativa. Os ratos tratados com injeções subcutâneas dos demais metabólitos apresentaram desempenho normal.

Loo et al., em 1980, verificou que o fenilacetato, produzido em quantidade excessiva no modelo animal de PKU, provoca um retardo na maturação das sinapses. Em 1979, Nigam & Labar observaram que os ratos tratados com Phe e alfa-metilfenilalanina por 21 dias mostram um decréscimo de 40% na densidade dos terminais sinápticos corticais, afetando preferencialmente os terminais menores localizados nas camadas mais superficiais do córtex.

Em 1983, Robain et al. demonstrou que a exposição de ratos ao fenilacetato nos primeiros 21 dias de vida provoca uma redução significativa no número de botões sinápticos, com decréscimo da ordem de 25% na camada molecular do cerebelo. Tanto a densidade quanto o número de perfis sinápticos estão reduzidos, em comparação ao controle pareado por idade.

Wen et alii, em 1980, observou que o fenilacetato, administrado em ratos do quarto ao vigésimo-primeiro dias de vida, produz redução regional no tamanho das porções IV, V, VIa e IX do vérmis cerebelar, redução na camada molecular, acúmulo de células da camada granular externa e de células neuroblásticas da retina, redução do número de fibras paralelas no córtex cerebelar e do número de axônios mielinizados no nervo óptico.

Loo et al., em 1985, constatou que a formação cerebral de acetilCoA a partir do beta-hidroxi-butarato não é afetada pela exposição pós-natal ao fenilacetato; entretanto, a utilização cerebral da acetilCoA está significativamente inibida na síntese de ácidos graxos e colesterol.

Em ratos, o mecanismo de eliminação hepática e renal do fenilacetato desenvolve-se somente após o nascimento, sendo extremamente baixo nas primeiras duas semanas de vida. Na terceira

semana, existe um aumento de cerca de 40% na atividade enzimática de metabolização do fenilacetato, mas o nível adulto somente é atingido aos 40 dias de vida. Se verdadeiro para seres humanos, isto poderia explicar a extrema vulnerabilidade do sistema nervoso à PKU, nos primeiros anos de vida (Loo et al., 1979).

Entretanto, Faull et al., em 1988 (citado por Hommes, 1991), demonstrou que existe na barreira hematoencefálica um gradiente para o fenilacetato, sendo a concentração plasmática cerca de 18 vezes maior que a cerebral. Além disso, com os novos métodos de estudo com cromatografia gasosa e espectrometria de massa, muito mais sensíveis, ficou provado que a concentração cerebral *in vivo* do fenilacetato é indetectável, mesmo sob dieta hiperfenilalaninêmica. Assim, é pouco provável que, em condições próximas às fisiológicas, ele seja o responsável pela neurotoxicidade na PKU.

O fenilpiruvato tem sido amplamente estudado em modelos experimentais de PKU. Em baixas concentrações, *in vitro*, ele inibe a oxidação do piruvato (um importante substrato para a fosforilação oxidativa cerebral) em frações mitocondriais de córtex de ratos, sem desacoplar a fosforilação (Gallagher, 1969). Em pacientes com PKU, o nível sanguíneo de fenilpiruvato eleva-se até 1 mg/100 ml, podendo apresentar um aumento de vinte vezes após uma sobrecarga oral de Phe. Assim, é possível que ocorra uma inibição da oxidação do piruvato também *in vivo* (Jervis et al., 1966, citado por Gallagher, 1969).

De acordo com Land & Clark (1973), em ratos, o fenilpiruvato inibe competitivamente a citrato sintase e acetilCoA carboxilase, prejudicando a síntese de ácidos graxos e o processo de mielinização cerebral. Além disso, segundo Benavides et al., 1976, o fenilpiruvato

inibe marcadamente a atividade da 3-hidroxiacetil-CoA desidrogenase e 3-oxoácido CoA transferase, enzimas importantes na utilização cerebral de corpos cetônicos para a obtenção de combustível celular. Ele interfere indiretamente na mielinização, pois os corpos cetônicos compõem uma das rotas metabólicas de formação da acetilCoA, necessária na síntese da mielina.

Hirano et al., em 1985, expôs fetos de rato à hiperfenilalaninemia materna em diferentes períodos da gestação; observou que um dano somático visível somente ocorreu após a exposição à hiperfenilalaninemia materna no último período da gestação, mas o retardo mental ocorreu em todos os fetos, independente do período gestacional ou tempo de exposição.

Este autor mediu a atividade de uma série de enzimas, entre as quais a CNPase (2', 3'- nucleotídeo cíclico 3'- fosfoidrolase, enzima marcadora da formação de mielina), acetilcolinesterase e colinesterase no cérebro de rato, aos 15 dias de vida, constatando que somente a primeira se encontrava diminuída. Este autor atribui o retardo mental nos ratos do modelo experimental de PKU a distúrbios no processo de mielinização (Hirano et al., 1985).

Berger et al., em 1980, também referiu uma redução no metabolismo da mielina em ratos com hiperfenilalaninemia, através da aferição da incorporação de lisina marcada radioativamente nos tecidos cerebrais e nas proteínas mielínicas. Porém, observou que a velocidade do metabolismo das proteínas cerebrais totais não apresentou diferença em relação aos controles.

Em suma, não existe concordância entre os diferentes grupos de pesquisa sobre a real causa do retardo mental na PKU. Existem, como

foi exemplificado acima, inúmeras teorias, bem como vários estudos com achados conflitantes. No momento em que iniciamos este estudo, não havia nenhum trabalho relacionando a concentração de opióides endógenos à PKU.

No item 1.3, serão descritos os principais modelos experimentais de PKU em ratos, e as razões pelas quais foi feita a escolha do modelo utilizado no presente trabalho.

A seguir, será sumarizado, no item 1.4, o histórico da investigação sobre os opióides endógenos. Serão abordados também os fatores que nos conduziram a pesquisar este aspecto do aprendizado e memória, visando investigar as causas do retardo mental em um modelo experimental de fenilcetonúria.

### 1.3. MODELOS EXPERIMENTAIS DE FENILCETONÚRIA

A PKU é geneticamente heterogênea e provavelmente engloba uma série de variantes fenotípicas da PAH ainda não perfeitamente caracterizadas. Dada a impossibilidade de realizar estudos *in vivo* em tecido cerebral humano, faz-se necessária a produção de um homólogo mendeliano da PKU em animais, o que se tornou possível apenas recentemente. Um rato mutante com deficiência de fenilalanina hidroxilase, o HPH-5, foi obtido pelo grupo de McDonald, Bode, Dove e Shedlovsky, em 1990. Entretanto, este tipo de animal ainda não foi comercializado internacionalmente para estudos (Scriver et al., 1989; Hommes, 1991; McDonald et al., 1990).

Por esta razão, utilizam-se atualmente como modelos experimentais de PKU ratos alimentados ou injetados com Phe, acompanhada ou não de um inibidor da PAH. Os inibidores mais usados são a p-clorofenilalanina (ClPhe) e a  $\alpha$ -metilfenilalanina (mePhe). Alguns autores utilizam também metabólitos da Phe, como o fenilacetato. Entretanto, como observa Scriver et al. (1989), não existem metabólitos "anormais" da Phe, e sim metabólitos em concentrações cerebrais alteradas.

A questão é se estes modelos aproximam-se da PKU humana suficientemente bem para permitir comparações de ordem bioquímica e morfogenética (Scriver et al., 1989, Del Valle et al., 1978).

Os ratos recém-nascidos apresentam uma maturação cerebral comparável à do cérebro de um feto humano com 18 semanas de

gestação. Assim, a PKU pode ser simulada em um estágio no qual a proliferação glial ainda está ocorrendo, permitindo a avaliação dos efeitos da Phe sobre o desenvolvimento neuronal. Aos 25 dias de vida, os ratos apresentam desenvolvimento cerebral comparável ao de uma criança de 8 anos de idade, permitindo assim em curto prazo o estudo de um período relativamente extenso da morfogênese (Del Valle et al., 1978; Lane et al., 1980).

Hirano et al., em 1985, utilizou em experimentos agudos um modelo de L-Phe oral isolada, na dose de 200 mg/100 g de peso corporal, forçada através de sonda gástrica. Utilizou ainda L-Phe a 7% adicionada à ração comercial; segundo o autor, isto mantém a concentração de Phe elevada de 100 a 200 vezes acima dos controles, com uma elevação da tirosina similar à observada no modelo que utiliza simultaneamente a administração de mePhe.

Lane et al., em 1980, realizou um estudo comparativo entre os efeitos da ClPhe e mePhe sobre o rato, com o uso crônico, na indução de PKU experimental. Segundo os mesmos, o uso de ClPhe mostrou-se insatisfatório, pois provocou efeitos nocivos sobre o crescimento, bem como efeitos colaterais incluindo o aumento da mortalidade. Já a mePhe mostrou-se livre de efeitos inespecíficos, embora alguns ratos apresentassem peso corporal e cerebral levemente reduzidos.

Os animais tratados simultaneamente com Phe e mePhe apresentaram Phe sérica elevada durante grande parte do dia, com uma injeção diária ou com injeções de 12 em 12 horas; entretanto, à medida que os animais cresciam, as injeções subcutâneas eram cada vez menos efetivas na manutenção da hiperfenilalaninemia, fazendo-se necessária uma correção da dose por 100 g de peso corporal (Lane et al., 1980).

Estudando o uso de ClPhe para a indução de PKU, Lipton et al., em 1967, constatou que a ClPhe não só inibe a PAH hepática, como também a triptofânio-5-hidroxilase no cérebro e outros tecidos. Além disso, ocorre uma redução da concentração de serotonina muito maior que na PKU. Assim, a ClPhe seria mais útil para investigar a correlação entre Phe e tirosina na PKU, mas poderia produzir informações enganadoras sobre o metabolismo.

Greengard et al., em 1976, determinou a resposta a várias doses de mePhe em ratos de 6 dias, quando a atividade de PAH seria 60% do valor do adulto. A inibição máxima ocorreu com 24  $\mu\text{mol}/10\text{ g}$  de peso. No mínimo 20 horas foram necessárias para a obtenção deste efeito. Com a associação de mePhe e Phe, 12 horas após a injeção, a concentração sérica de Phe ainda era mais de 10 vezes maior que os controles. Em ratos tratados cronicamente, a concentração de Phe aumentou cerca de 33 vezes o normal. As concentrações de Phe no plasma de pacientes não tratados situar-se-iam entre 15-25 vezes o normal. Assim, a associação de mePhe à Phe seria um modelo aceitável para a PKU.

Em nossos laboratórios, foram testados diferentes modelos de indução de PKU, crônicos e agudos, desenvolvendo-se um sistema de doses crescentes de acordo com a idade e peso corporal dos animais, de forma a superar a "tolerância" desenvolvida pelo animal à droga. Neste estudo, utilizamos a injeção de Phe de 12 em 12 horas, acompanhada de uma injeção diária matinal de mePhe, de acordo com o modelo estudado por Castilhos em 1986.

## **1.4. OPIÓIDES ENDÓGENOS E SUA RELAÇÃO COM O APRENDIZADO E MEMÓRIA**

### **1.4.1. Opióides endógenos em seres humanos; aplicação clínica**

A expressão "opióides endógenos" é utilizada para referir-se a um grupo de peptídeos do sistema nervoso central, com propriedades biológicas semelhantes às dos opióides de ocorrência na natureza. As endorfinas são assim denominadas por corresponderem funcionalmente a uma morfina endógena (Adler, 1980).

A identificação e classificação de vários subtipos de receptores opióides levou à investigação de novos peptídeos opióides, sendo atualmente conhecidos mais de 20 peptídeos diferentes. Muitos deles encontram-se sob investigação; embora suas funções não estejam completamente elucidadas, sabe-se que podem atuar como neuro-hormônios, neurotransmissores ou neuromoduladores.

Um problema técnico importante é a escassez de fármacos específicos e seletivos que possam bloquear ou estimular somente um dado sistema receptor-peptídeo. Além disso, mesmo os anticorpos apresentam reação cruzada entre mais de um peptídeo da mesma classe (Terenius, 1984; Blaszczyński & Winter, 1984).

As endorfinas, objeto deste estudo, não fogem à regra. Por exemplo, o antagonista naloxone interage de modo complexo com os vários receptores: é um antagonista eficiente após ligação ao receptor mu (com alta afinidade para a dinorfina e beta-endorfina) e um

antagonista fraco para os receptores delta e kappa (respectivamente com afinidade pelas encefalinas e pela dinorfina) (Terenius, 1984).

A função biológica das endorfinas em seres humanos tem sido amplamente estudada, levando a conclusões contraditórias de vários autores. Em seres humanos, inicialmente observou-se uma relação entre distúrbios psiquiátricos (notadamente a esquizofrenia e transtornos afetivos) e níveis elevados ou diminuídos de endorfinas plasmáticas e líquóricas.

Verificou-se que, quando administrados como fármacos, os opióides endógenos produzem alterações de humor semelhantes a quadros depressivos e, em certos casos, sintomas psicóticos e esquizofreniformes. Além disso, os pacientes deprimidos e esquizofrênicos possuem limiares mais elevados à sensação de dor. Entretanto, a administração do antagonista naloxone fornece elementos contraditórios, com melhora, piora ou ausência de alterações nos pacientes (Blaszczynski & Winter, 1984).

Berger et al., em 1986, realizou uma extensa revisão sobre os estudos relativos a beta-endorfinas em pacientes psiquiátricos. Quanto à esquizofrenia, os achados eram controversos: vários autores sustentavam que estaria associada a uma elevação na concentração plasmática ou líquórica de beta-endorfinas, enquanto outros relatavam uma redução na mesma. Os principais problemas destes estudos, abundantes na década de 70 e início de 80, foram a falta de controles, estudos não-duplo-cegos, uso concomitante de medicação neuroléptica e uso de doses intravenosas elevadas e heterogêneas de beta-endorfinas numa tentativa de provocar a remissão dos sintomas (o que foi obtido em alguns pacientes) (Berger et al., 1986; Naber, 1981).

Quanto à depressão unipolar, um estudo sugeriu que o uso intravenoso de beta-endorfina tornava os pacientes hipomaniacos; porém, não foram utilizados controles. Outro estudo, realizado por Risch, em 1982 (citado por Berger et al., 1986), verificou que a concentração plasmática matinal de beta-endorfina era significativamente maior em pacientes deprimidos do que em controles pareados por sexo e idade.

Alexopoulos, em 1983, comparou 10 pacientes com depressão unipolar sintomática e 16 controles normais. Não observou diferenças significativas entre eles quanto à concentração plasmática de beta-endorfinas. Entretanto, após submetidos a eletroconvulsoterapia, todos os pacientes deprimidos apresentaram um aumento de aproximadamente 3 vezes na concentração plasmática da mesma, provavelmente devido à liberação causada pelo procedimento.

Já em relação à doença bipolar, tendo em vista os achados de uma série de estudos iniciais, a Organização Mundial de Saúde realizou um estudo colaborativo com a administração de naloxone a pacientes maníacos, o que supostamente melhoraria os sintomas, e não registrou efeitos após doses elevadas do mesmo.

Risch et al., em 1980, realizou um estudo em voluntários normais, administrando fisostigmina na doença bipolar. As alterações de humor induzidas pela fisostigmina (depressão, hostilidade e confusão) correlacionaram-se positivamente com os níveis de beta-endorfina, mas não com o cortisol plasmático, sugerindo haver uma via de ação da beta-endorfina mediada pela acetilcolina, a qual poderia estar hiperfuncionante na depressão (citado por Berger et al., 1986).

Atkinson et al., em 1983, realizou medidas da imunorreatividade tipo beta-endorfina plasmática em pacientes psiquiátricos, pacientes com dor crônica e voluntários normais. Verificou que os pacientes psiquiátricos e com dor crônica apresentavam medidas de imunorreatividade tipo beta-endorfina significativamente maior que os controles; além disso, os pacientes com síndrome dolorosa também apresentavam beta-endorfinas significativamente maiores que os pacientes psiquiátricos.

Entretanto, um estudo realizado por Alessio et al., em 1988, não evidenciou diferenças entre pacientes com ou sem dor crônica devido a um quadro de hérnia de disco cervical ou lombar, em relação à imunorreatividade tipo beta-endorfina medida no líquido, coletado antes do procedimento cirúrgico de correção.

Nappi et alii, em 1988, avaliou a beta-endorfina, beta-lipotropina e ACTH, os quais são codificados pelo mesmo gene, através da pró-opiomelanocortina, na demência degenerativa (Alzheimer pré-senil e senil) e vascular. Verificou que a beta-endorfina somente está reduzida na doença de Alzheimer, enquanto na doença vascular cerebral transitória ou permanente (acidente vascular cerebral) a mesma está dentro dos limites normais. Segundo ele, em indivíduos normais, a beta-endorfina mostra-se em níveis inversamente proporcionais à idade, enquanto na doença de Alzheimer ela apresenta uma redução severa. Entretanto, a concentração de beta-endorfinas também está reduzida na doença de Parkinson não-tratada, sem demência, o que indica não ser este opióide endógeno o responsável direto e isolado pela sintomatologia cognitiva demencial (Nappi et al., 1988).

Slowinska et al., em 1988, analisou o ritmo circadiano do ACTH, cortisol e beta-endorfina em pacientes obesos, hipertensos e controles normais pareados para idade e sexo, antes e depois da administração de clonidina. Observou que, em indivíduos normais, a beta-endorfina apresenta um ritmo circadiano, e a administração de clonidina, diminui a secreção de beta-endorfina. Em obesos, não ocorre o ritmo circadiano e as concentrações de beta-endorfina são significativamente maiores. Em hipertensos, o ritmo pode estar alterado ou não; naqueles em que há redução da concentração plasmática de beta-endorfina, há uma resposta pressórica de redução da pressão arterial à administração de clonidina. O naloxone, em seres humanos, não possui efeito sobre a ação pressórica da clonidina. Ou seja, a beta-endorfina exerce um efeito hemodinâmico ainda não completamente esclarecido, atuando através do sistema nervoso simpático sobre os centros reguladores da pressão arterial (Slowinska, 1988).

Nappi et al., em 1989, comparou as concentrações plasmáticas de beta-endorfina em mulheres com ovário policístico, obesas e normais, e mulheres sem disfunção ovariana, obesas e normais. Constatou que a concentração de beta-endorfinas mostrou-se significativamente elevada em obesas, independente da função ovariana.

Geisbergen et al., em 1989, estudou o efeito pressórico da beta-endorfina endógena associada à alfa-metildopa. Normalmente, a associação de ambas produz uma queda na pressão arterial. A administração de um antisoro anti-beta-endorfina ou anti-dinorfina impediu a redução da pressão arterial patrocinada pela alfa-metildopa, demonstrando a relação destes opióides com a regulação da pressão arterial.

Como se pode ver, os opióides endógenos apresentam múltiplos efeitos clínicos: além da analgesia, possuem efeitos sobre a pressão arterial, motilidade gastrointestinal e atividade motora. Possuem também efeitos isolados tão díspares como a inibição das contrações eletricamente induzidas dos vasos deferentes do camundongo, contração eletricamente induzida do músculo liso do íleo de cobaio (utilizado para estudos da fisiologia do trato gastrointestinal), e inibe a atividade da adenilato-ciclase em cultura de células de neuroblastoma-glioma (Smith, 1984).

### 1.4.2. Opióides endógenos versus aprendizado/memória

O aprendizado, definido como a aquisição de experiências inéditas ao indivíduo, é complementado pela memória, conceituada como a retenção e recordação (ou evocação) destas experiências. A avaliação da consolidação da memória só pode ser feita de forma indireta através do teste, submetendo-se o indivíduo novamente à experiência anterior (Netto, 1984).

Em animais experimentais, o aprendizado somente pode ser avaliado na forma de um comportamento quantificável; para tanto, utiliza-se a supressão de respostas inatas, a indução de comportamentos não-naturais ou a exposição a ambientes aos quais o animal não está familiarizado, como a caixa padronizada para a habituação ao campo aberto. Para fins de análise, denominamos *treino* à primeira exposição à novidade, e *teste* à segunda exposição, realizada 24 horas após. Considera-se que ocorreu aprendizado se houve uma melhora na performance do animal da primeira para a segunda sessão (Netto, 1987).

A experiência nova conduz à aquisição de comportamento (estratégia adequada à situação) e informação. Após o armazenamento dos mesmos (definido como a representação neural hipotética do complexo informacional), ocorre a consolidação (processo hipotético responsável pela modulação do armazenamento, determinando a intensidade da representação neural). Finalmente, no momento do teste ocorre a evocação, que nada mais é que a emissão de resposta a uma

situação ambiental previamente vivenciada e armazenada (Izquierdo e Netto, 1985).

A exposição a uma novidade, em uma ampla gama de experimentos, normalmente acompanha-se de um decréscimo na imunorreatividade tipo beta-endorfina cerebral em ratos (a qual, devido à sensibilidade cruzada do anticorpo utilizado para aferição, abrange a beta-endorfina e beta-lipotropina). Este decréscimo é observado em se tratando de tarefa aversiva ou não, independente do tipo e duração do experimento (Izquierdo et alii, 1980, 1984; Netto et alii, 1985).

No modelo animal de PKU utilizado por este grupo de pesquisa, optou-se por realizar uma tarefa não-aversiva (habituação ao campo aberto) por ser a que apresenta menor interferência quanto ao nível de estresse do animal, produzindo um menor número de alterações motivadas pela tarefa em si e permitindo um maior discernimento em relação aos efeitos do tratamento farmacológico sobre o aprendizado e memória. De acordo com Strupp (1984), as tarefas não-aversivas são as mais adequadas para o estudo do aprendizado e memória na hiperfenilalaninemia crônica e modelo animal de PKU.

Segundo Izquierdo (1991), inicialmente se acreditava que o efeito dos opióides sobre a memória seria de facilitação pura e simples, devido a um raciocínio errôneo de que a adição aos opióides, provocando gratificação, implicaria em facilitação da memória. Entretanto, vários estudos que aparentemente demonstravam esta facilitação foram realizados com tarefas aversivas, e a retenção poderia ser facilitada pelo choque, e não pelo opióide em si. A facilitação da memória pelo antagonista opióide naloxone veio contradizer este achado.

Posteriormente, vários autores relataram que a injeção de beta-endorfina antes ou imediatamente após o treino dificultava a retenção; entretanto, este efeito dependia do tempo decorrido do treino à injeção e também da dose da droga. A beta-endorfina possui uma curva de dose-resposta em U invertido, perdendo seu efeito à medida que a dose aumenta. A administração de beta-endorfina ou exposição à novidade antes do teste produz um aumento da evocação reversível com naloxone ou naltrexone, indicando o surgimento de um tipo de dependência de estado. Nos animais tratados com beta-endorfina pós-treino, a dependência seria mais intensa, e assim, mais difícil de superar com tratamentos pré-teste (Izquierdo, 1991)

Segundo Kovacs & de Wied (1981) em tarefas de esquiva passiva, a administração de beta-endorfina facilita a retenção de forma dependente da dose e tempo de aplicação após o treino e antes do teste. Esta facilitação não é reversível com o uso do antagonista opióide naltrexone, sugerindo uma via de ação independente dos receptores sensíveis a este antagonista.

Vários autores (Kloet & de Wied, 1980; de Wied et alii, 1978 [citados por Kovacs & de Wied, 1981]) encontraram que pequenas quantidades de beta-endorfina administrada por via subcutânea afetava o desempenho em tarefas de esquiva ativa, bem como o estado de alerta do animal. Com base no estudo de Ader et al., realizado em 1972, Kovacs & de Wied, D, em 1981, realizaram um experimento para avaliar o efeito da beta-endorfina na consolidação da memória em ratos.

Acredita-se que a consolidação da memória ocorre dentro de algumas horas após a realização da tarefa; no estudo de Kovacs & de Wied (1981), a administração subcutânea de beta-endorfina humana em

ratos, imediatamente após o treino, não afetou a esquivas passiva se utilizada em baixas doses. Em doses elevadas, facilitou a esquivas passiva.

Em contraste, quando injetada 1 hora antes do teste, a dose menor produziu uma facilitação da esquivas passiva, mas a dose maior não obteve efeito, indicando a presença de uma atividade dependente da dose. Os autores concluíram que as doses menores de beta-endorfinas expressam a atividade do peptídeo em si, enquanto as doses elevadas apresentam uma curva de efeito bimodal, devido à conversão de beta-endorfina em alfa e gama-endorfina, com atividades distintas.

Austen et al. (1977) (citados por Kovacs & de Wied, 1981) demonstrou a presença desta conversão *in vitro*, em fração sinaptossomal de cérebro de rato.

O efeito da beta-endorfina administrada é variável entre diferentes linhagens de ratos. Já em 1985, Frischknecht et al. havia observado que, em relação à morfina, os fatores genéticos influenciavam sobre a ingestão da mesma, bem como sobre seus efeitos no consumo de alimentos, analgesia, atividade locomotora, aprendizado e memória.

Como foi visto anteriormente, as crianças fenilcetonúricas apresentam, entre outros sintomas, déficit no desenvolvimento neuropsicomotor e no aprendizado, que se agrava progressivamente até o retardo mental. Este último deve-se sem dúvida a um somatório de fatores, muitos dos quais ainda sob investigação. Na PKU, a neuroquímica basal do cérebro está alterada. Existe uma redução global da síntese protéica e alterações específicas na síntese de polirribossomos, RNA mensageiro, mielina e proteínas derivadas da mesma. A desmielinização ocorre mesmo em adultos, após a suspensão da dieta pobre em fenilalanina, tendo sido documentada *in vivo*

indiretamente, por alterações no eletroencefalograma, e diretamente, através da ressonância nuclear magnética. Assim, as conexões interneuronais também sofrem alteração, o que é mais um fator complicando a investigação (Krause et al., 1986; Pearsen et al., 1990; Sriver et al., 1989; Wyngaarden & Smith, 1988).

No momento em que este estudo foi iniciado, não havia nenhum trabalho publicado referente à PKU e opióides endógenos. Somente em 1991 surgiram alguns estudos sobre o tema. Bach et al., em 1991, estudou os níveis líquóricos de beta-endorfinas em 13 pacientes com PKU e 6 controles da mesma idade. Encontrou uma tendência à elevação dos níveis de beta-endorfina nos pacientes com PKU. As concentrações de beta-endorfina e fenilalanina líquóricas tiveram correlação linear estatisticamente significativa. Segundo o autor, estes dados sustentam a hipótese de que existe alteração do sistema opióide endógeno na PKU.

Entretanto, Nielsen et al., em 1991, estudou crianças com síndrome de Rett e compararam com adolescentes assintomáticos portadores de PKU, diagnosticada e tratada precocemente. Constataram que ambos os grupos apresentavam nível elevado de imunorreatividade tipo beta-endorfina no líquido, embora o grupo PKU não apresentasse qualquer dos sintomas do grupo portador da síndrome de Rett, concluindo que este achado provavelmente não apresentava significado fisiopatológico.

Os ratos do modelo animal de PKU utilizado neste estudo, através da injeção subcutânea de duas doses diárias de fenilalanina e uma dose diária do inibidor da PAH, alfa-metilfenilalanina, apresentaram em um estudo-piloto inicial uma ausência de redução no número de

respostas de orientação durante o teste, indicando que o modelo animal de PKU poderia apresentar déficit no aprendizado e memória (Castilhos, 1986).

Matthies, em revisão de 1989, discorre sobre algumas premissas teóricas do aprendizado e memória. Segundo ele, "o aprendizado e memória exibem diversos aspectos fenomenológicos, conforme o nível de organização biológica considerado pelo observador", isto é, podem ser estudados tanto a nível psicológico ou comportamental quanto a nível bioquímico-molecular.

A abordagem conceitual mais aceita atualmente para o estudo do aprendizado e memória, segundo Matthies, é a teoria conexãoista. Esta baseia-se parcialmente na teoria dos sistemas, em que a estrutura funcional de um sistema é definida pelo número e propriedades de seus componentes, bem como pelo número e propriedades de suas relações ou conexões mútuas. Assim, uma alteração no sistema pressupõe uma alteração em sua estrutura funcional, mas nem toda alteração funcional conduz a uma modificação no sistema (Matthies, 1989).

Aplicando-se este conceito ao cérebro humano, pode-se encarar os neurônios como elementos básicos do mesmo (complementados por células estruturais, como a glia e vasculatura), e as sinapses como suas conexões básicas para a estrutura funcional. Supondo que o número e função dos neurônios não se modifique durante o aprendizado e memória, alterações nestes últimos seriam devidas a mudanças funcionais, isto é, nas propriedades ou número de sinapses. Isto seria regulado no indivíduo através de dois sistemas básicos: 1) o surgimento de uma hierarquia de controle; 2) uma estrutura funcional multiestável (conexões sinápticas ativadas somente quando necessário) conectando

sistemas ultraestáveis (conexões sinápticas perenes ou sempre ativas) por meio de relações variáveis (Matthies, 1989).

Assim, a informação chega ao cérebro em forma de sinal eletroquímico; a molécula do neurotransmissor somente torna-se informação após a interação com um sistema funcional em particular. Assim, uma cultura de células neuronais não gera memória no sentido comportamental, embora possua os elementos necessários à mesma, pela simples razão que não possui estrutura funcional conectiva (Matthies, 1989). Esta abordagem expõe a dificuldade de avaliar o aprendizado e memória em diversos modelos animais, buscando semelhanças aos achados em seres humanos.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo primordial deste trabalho é verificar a existência ou não de alterações no sistema beta-endorfinico em um modelo animal de fenilcetonúria, através da determinação de imunorreatividade tipo beta-endorfina por radioimunoensaio, bem como através de testes comportamentais envolvendo a exposição à novidade.

A existência de uma perturbação neste sistema, relacionado ao aprendizado e memória, pode somar-se às várias alterações bioquímicas e moleculares já descritas para a fenilcetonúria, tanto em animais quanto em seres humanos, numa tentativa de explicar a patogênese do retardo mental neste erro inato do metabolismo.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1.a. Animais experimentais (primeiro grupo)**

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas, provenientes do Biotério do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, criados em número de oito por gaiola e desmamados aos 21 dias de idade. Após o desmame, foram alimentados com ração comercial *ad libitum* sem a adição de fenilalanina. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado, com ciclo de 12 horas de luminosidade.

Um total de 38 animais foi aproveitado para esta primeira fase, sendo machos e fêmeas igualmente distribuídos entre os grupos de tratamento. O peso corporal médio dos animais, aos 90 dias de vida, foi de 269,6 g +/- 21,44 para os machos e 199,4 g +/- 12,35 para as fêmeas.

O peso médio do hipotálamo foi de 0,068 g +/- 0,011 g. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os sexos, quanto ao peso do cérebro e peso do hipotálamo. Também não foi observada diferença entre os grupos de tratamento, quanto ao peso corporal, peso do cérebro e peso do hipotálamo.

### 3.1.b. Tratamento farmacológico

Os ratos foram randomicamente distribuídos em três grupos: não-manipulados, salina e fenilcetonúria (PKU), de acordo com o seguinte protocolo:

1) Não-manipulados: ratos que não receberam injeção subcutânea dos seis aos vinte e oito dias de vida.

2) Salina: ratos tratados dos seis aos vinte e oito dias de vida com injeção subcutânea de solução salina a 0,85%, de doze em doze horas, em volume correspondente ao volume calculado por peso do grupo fenilalanina.

3) PKU: ratos tratados dos seis aos vinte e oito dias de vida com injeção subcutânea de uma solução de fenilalanina a 3,6 g%, de doze em doze horas, em doses crescentes de acordo com a idade:

6 -12 dias = 0,35 mg de fenilalanina / g de peso corporal

13-17 dias = 0,50 mg de fenilalanina / g de peso corporal

18-22 dias = 0,75 mg de fenilalanina / g de peso corporal

23-28 dias = 0,90 mg de fenilalanina / g de peso corporal

Além disso, este grupo recebeu também, uma vez ao dia, injeção subcutânea de uma solução de alfa-metilfenilalanina em concentração de 1,43 g%, em uma dose de 0,43 mg/g de peso corporal, invariável dos 6

aos 28 dias de vida.

Após o término do tratamento, os ratos foram separados por sexo em gaiolas diferentes, sendo mantidos até os 90 dias de vida com ração comercial Germânia e água *ad libitum*.

### **3.1.c. Estímulo comportamental**

Aos 90 dias de vida, os animais foram divididos em dois grupos, um dos quais foi imediatamente sacrificado. O restante foi exposto à novidade (habituação em campo aberto) e sacrificado a seguir.

A habituação em campo aberto foi realizada em duas caixas padronizadas de eucatex medindo 50 x 60 x 40 cm, com a face frontal envidraçada e o piso revestido por linóleo e cruzado por cinco linhas brancas, formando 12 retângulos idênticos.

Os animais foram colocados de frente para o canto posterior esquerdo da caixa e, em intervalos de 2 minutos, foram registrados o número de respostas de orientação (*rearing*), caracterizadas como a elevação completa do animal sobre as duas patas traseiras, retirando ambas as patas dianteiras do solo; o número de cruzamentos sobre as linhas brancas do piso da caixa (*crossing*), tomado como medida da atividade locomotora; o número de bolos fecais e o número de atividades de limpeza (*grooming*), definidas como o cruzamento de ambas as patas dianteiras sobre o focinho, estando o animal sentado sobre as patas traseiras. Para fins de análise, estes últimos foram considerados indicativos de estresse do animal.

### **3.1.d. Dosagem de imunorreatividade tipo $\beta$ -endorfina**

Aos 90 dias de vida, uma parte dos animais foi randomicamente selecionada para decapitação imediata. O restante foi submetido a uma sessão de habituação em campo aberto e a seguir decapitado.

Após a decapitação, o cérebro foi retirado e colocado sobre placa de Petri com gelo e sal grosso, mantendo-se à temperatura de cerca de 4 graus centígrados. A seguir, procedeu-se à dissecação do hipotálamo. O cérebro e hipotálamo foram pesados, sendo este último colocado em tubo de ensaio de vidro siliconizado e incubado com 2 ml de ácido tricloroacético 1 N a 98 oC, por 15 minutos.

O cérebro foi desprezado. O material resultante do hipotálamo incubado foi homogeneizado e mantido sob agitação constante por 3 horas a 4 oC. A seguir, foi centrifugado a 1000 g por uma hora em centrífuga refrigerada (Sorvall). O sobrenadante foi congelado e posteriormente submetido à técnica de imunorreatividade tipo beta-endorfina, de acordo com as instruções do fabricante do kit NEK-003 Dupont-NEN, seguindo-se o procedimento utilizado anteriormente por Izquierdo e colaboradores.

Toda a vidraria utilizada foi siliconizada. Os reagentes foram resfriados em banho de gelo; o padrão e o marcador de beta-endorfina  $^{125}\text{I}$  foram preparados imediatamente antes do uso. A curva-padrão foi pipetada de acordo com as orientações do kit.

Inicialmente, os tubos denominados de contagem total (1-2) e os brancos (3-4) receberam 200  $\mu\text{l}$  de tampão; os tubos denominados de

padrão-zero (5-6) receberam 100 µl de tampão.

Em cada tubo-teste, foram pipetados 100 µl da amostra a ser analisada, 100 µl de marcador diluído imediatamente antes do uso e 100 µl de solução de anticorpo. Os tubos 5 e 6 também receberam 100 µl de solução de anticorpo.

A seguir, todos os tubos foram colocados sobre vórtex durante cinco segundos e incubados a 4 oC por 24 horas. Após a incubação, todos os tubos, exceto os de contagem total (1-2) receberam 0,5 ml de suspensão concentrada de carvão a 1,6%. Foram pipetados 0,5 ml de tampão, nos tubos 1 e 2.

Todos os tubos foram novamente colocados sobre vórtex por cinco segundos e incubados em banho de gelo por um mínimo de 15 minutos. Então, os tubos foram centrifugados em 2400 rpm em centrífuga refrigerada (Sorvall) por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido a tubos de vidro siliconizado e lido em contador gama Elscint, contra um padrão de iodo radioativo  $^{125}\text{I}$ .

O cálculo da concentração percentual de substância ligada para cada amostra foi realizado de acordo com a fórmula:

$$\%B/ B_0 = \frac{\% B \text{ da amostra ou tubo de curva-padrão}}{\%B \text{ do padrão-zero}} \times 100$$

Utilizando papel semi-logarítmico, os dados da curva-padrão foram plotados para se obter, por interpolação, a correspondente concentração em pg de  $\beta$ -endorfina das amostras, sendo feitas as devidas correções para a diluição.

### **3.2.a. Animais experimentais (segundo grupo)**

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas, provenientes do Biotério do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, criados em número de oito por gaiola e desmamados aos 21 dias de idade. Após o desmame, foram alimentados com ração comercial *ad libitum* sem a adição de fenilalanina. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado, com ciclo de 12 horas de luminosidade.

Um total de 61 animais foi utilizado nesta fase, sendo 33 machos e 28 fêmeas igualmente distribuídos entre os grupos de tratamento. O peso corporal médio dos animais, aos 90 dias de vida, foi de  $314,04 \pm 28,52$  g para os machos e  $285,64 \pm 30,0$  g para as fêmeas. Não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição dos ratos quanto ao sexo e peso, em relação à distribuição dos grupos para os tratamentos crônicos e agudos, descritos a seguir.

### 3.2.b. Tratamento farmacológico

Inicialmente, os ratos foram randomicamente distribuídos em dois grupos, salina e fenilalanina, de acordo com o seguinte protocolo:

1) Salina: ratos tratados dos seis aos vinte e oito dias de vida com injeção subcutânea de solução salina a 0,85%, de doze em doze horas, em volume correspondente ao volume calculado por peso do grupo fenilalanina.

2) Fenilalanina: ratos tratados dos seis aos vinte e oito dias de vida com injeção subcutânea de uma solução de fenilalanina a 3,6 g%, de doze em doze horas, em doses crescentes de acordo com a idade:

6 -12 dias = 0,35 mg de fenilalanina / g de peso corporal

13-17 dias = 0,50 mg de fenilalanina / g de peso corporal

18-22 dias = 0,75 mg de fenilalanina / g de peso corporal

23-28 dias = 0,90 mg de fenilalanina / g de peso corporal

Este grupo recebeu, uma vez ao dia, injeção subcutânea de uma solução de alfa-metilfenilalanina em concentração de 1,43 g%, em uma dose de 0,43 mg/g de peso corporal, invariável, dos 6 aos 28 dias de vida.

Após o término do tratamento, os ratos foram separados por sexo em gaiolas diferentes, sendo mantidos até os 90 dias de vida com ração comercial normal livre de fenilalanina. Aos 90 dias de vida, todos os animais foram submetidos à habituação em campo aberto. Imediatamente após, foram redistribuídos em outros três grupos,

conforme descrito a seguir:

1) SAL-SAL : receberam imediatamente após o treino e 6 minutos antes do teste uma injeção intraperitoneal de solução salina a 0,85%, em volume comparável ao calculado para a solução de beta-endorfina (8,5 mg de NaCl/ kg de peso corporal).

2) BETA-SAL : receberam imediatamente após o treino uma injeção intraperitoneal de beta-endorfina de rato a 1  $\mu\text{g}$  / ml, na dose de 1  $\mu\text{g}$  por kg de peso corporal, e 6 minutos antes do teste uma solução salina a 0,85% em volume comparável.

3) BETA-BETA : receberam imediatamente após o treino e 6 minutos antes do teste uma injeção intraperitoneal de beta-endorfina de rato a 1  $\mu\text{g}$  / ml, na dose de 1  $\mu\text{g}$  / kg de peso corporal.

A distribuição final dos animais é sumarizada na Tabela 3.2.1., a seguir:

Tabela 3.2.1. Distribuição dos animais por tratamento agudo e crônico

	SAL-SAL	BETA-SAL	BETA-BETA	Total
SAL	11	11	11	33
PHE	11	9	11	31
Total	22	20	22	64

### 3.2.c. Avaliação comportamental

Os ratos foram submetidos à habituação ao campo aberto, realizada em uma caixa de madeira medindo 50 x 60 x 40 cm, com a face anterior envidraçada, com o piso revestido por linóleo e atravessado por 5 linhas brancas, formando 12 retângulos idênticos.

Os ratos foram colocados de frente para o canto posterior esquerdo da caixa, e durante 2 minutos registrou-se o número de elevações completas sobre as patas traseiras (resposta de orientação ou *rearing*), o número de cruzamentos sobre as linhas brancas (cruzamento ou *crossing*), o número de bolos fecais e de cruzamentos de ambas as patas dianteiras sobre o focinho, estando o animal sentado sobre as patas traseiras (atividade de limpeza ou *grooming*).

A diferença entre os resultados das respostas de orientação no treino e teste foi considerada uma medida da memória do animal. Os dados foram comparados quanto ao treino e teste, realizados durante 2 minutos cada um e ocorrendo com 24 horas de intervalo.

### **3.3. Análise estatística**

Foram utilizados para análise os programas ABSTAT e SPSS. Utilizaram-se os seguintes métodos: Teste t de Student, ANOVA, ANOVA para múltiplas medidas, MANOVA e teste F para efeito simples. A forma de utilização dos mesmos será apresentada e discutida no ítem 4 (Resultados).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. PRIMEIRO GRUPO EXPERIMENTAL : determinação da imunorreatividade tipo beta-endorfina no modelo experimental de PKU e resposta à novidade.**

Os animais pertencentes ao primeiro grupo experimental não apresentaram diferenças significativas quanto ao peso corporal, peso cerebral e peso do hipotálamo (g) aos 90 dias de vida, entre o modelo animal de PKU e os controles. Também não foi observada diferença significativa entre os sexos, quanto ao peso cerebral e do hipotálamo.

Alguns autores referem uma redução de peso em ratos tratados hiperfenilalaninêmicos; entretanto, a maioria dos trabalhos nos quais se verifica essa redução utilizam o inibidor p-clorofenilalanina. Neste trabalho, foi utilizado o inibidor  $\alpha$ -mePhe. (Lane et al., 1980; Scriver et al., 1989)

Entretanto, os dados são referentes à pesagem realizada aos 90 dias de vida, imediatamente antes da exposição à novidade e/ou abate, quando o tratamento crônico realizou-se dos 6 aos 28 dias de vida do animal. Assim, caso o animal tenha apresentado algum déficit de peso corporal durante o tratamento, houve tempo suficiente para a recuperação.

Vale ressaltar que a análise dos pesos corporais dos animais aos 6, 14 e 28 dias de vida não revelou diferenças significativas entre os grupos, embora se observe uma discreta tendência à redução do peso corporal aos 28 dias, no grupo PKU, não significativa.

A Tabela 4.1.1. apresenta os dados de peso do cérebro e peso do hipotálamo destes animais, aos 90 dias de vida. Os dados referentes ao peso médio dos animais, aos 6, 14 e 28 dias de vida, são apresentados na Tabela 4.1.2.

**Tabela 4.1.1. Peso cerebral e peso do hipotálamo (g) dos ratos NM, SAL e PKU aos 90 dias de vida.**

	Grupos experimentais		
	NM (21)	SAL (21)	PKU (13)
Peso do cérebro (g)	0,977+/-0,063	0,921+/-0,082	0,948+/-0,049
Peso do hipotálamo (g)	0,071+/-0,010	0,068+/-0,011	0,065+/-0,015

Resultados expressos em média +/- desvio-padrão; entre parênteses, o número de animais.

**Tabela 4.1.2. Peso corporal médio (g) dos animais aos 6, 14 e 28 dias de tratamento crônico.**

	NM (21)	SAL (21)	PKU (13)
6 dias	12,35 +/- 1,12	12,42 +/- 1,25	12,57 +/- 1,34
14 dias	28,86 +/- 1,76	25,01 +/- 2,53	25,20 +/- 1,55
28 dias	67,27 +/- 3,12	67,93 +/- 2,05	63,33 +/- 5,89

Resultados expressos em média +/- desvio-padrão; entre parênteses, o número de animais.

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos PKU, Salina e Não-manipulado. A seguir, ao completar 90 dias de vida, foram randomicamente designados para sacrifício imediato ou sacrifício após exposição à novidade.

A metade dos animais foi exposta ao campo aberto por um período de oito minutos, sendo a seguir sacrificada. Assim, foi possível registrar uma curva de atividade motora (expressa em número de cruzamentos), de reconhecimento do ambiente (expressa em número de respostas de orientação) e de estresse (registrado através do número de atividades de

limpeza e de bolos fecais) ao longo de oito minutos.

Verificou-se que não houve diferença, ao longo do tempo, na atividade motora e nível de estresse dos animais (dados não apresentados). O número de cruzamentos manteve-se constante ao longo dos oito minutos, não apresentando diferença entre os grupos de tratamento ( $F(2,25)=0,90$ ;  $p=0,419$ ).

O número de atividades de limpeza, analisado por ANOVA de duas vias com teste de Friedman, não apresentou variação significativa (SAL:  $p = 0,1087$ ; NM:  $p = 0,8471$ ; PKU:  $p = 0,9903$ ).

O número de bolos fecais, analisado por ANOVA de duas vias com teste de Friedman, também não apresentou diferença significativa ao longo do tempo, entre os grupos (SAL:  $p = 0,1322$ ; NM:  $p = 0,4251$ ; PKU:  $p = 0,8525$ ).

Os controles SAL e NM não apresentam diferenças entre si no número inicial de respostas de orientação, quando analisados com ANOVA utilizando o teste F de efeito simples ( $F(1,18)=0,513$ ;  $p=0,458$ ).

Entretanto, os grupos controles (SAL e NM) apresentaram um decréscimo significativo no número de respostas de orientação ao longo do tempo, o qual não foi observado no grupo PKU. Ou seja, existe diferença entre os tratamentos no número de respostas de orientação ao longo do tempo ( $F(3,75)=9,98$ ;  $p<0,001$ ), e entre os vários grupos ( $F(6,75)=3,11$ ;  $p<0,01$ ).

A Tabela 4.1.3. apresenta as médias e desvios-padrão do número de respostas de orientação ao longo do tempo, para os diferentes tratamentos.

A Tabela 4.1.4. apresenta as médias e desvios-padrão do número de cruzamentos ao longo do tempo.

**Tabela 4.1.3. Número de respostas de orientação ao longo de oito minutos.**

Tempo	SAL (10)	NM (10)	PKU (8)
0-2 min	21,3+/-4,83	21,4+/-3,47	13,62+/-3,58
2-4 min	17,4+/-4,32	17,6+/-4,99	14,75+/-5,06
4-6 min	15,8+/-6,34	15,3+/-5,12	14,37+/-4,53
6-8 min	15,0+/-5,45	10,7+/-4,71	13,62+/-3,11

Resultados expressos em média +/- desvio-padrão; entre parênteses, o número de animais.

\*Existe diferença entre os números iniciais de respostas de orientação, mas somente se considerados isoladamente dos restantes (teste Qui-quadrado,  $p < 0,01$ )

\*Existe diferença entre os grupos no número de respostas de orientação ao longo do tempo ( $F(3,75)=9,98; p < 0,001$ ). A interação entre os grupos ao longo do tempo mostrou que são diferentes entre si ( $F(6,75)=3,11; p < 0,01$ ).

**Tabela 4.1.4. Número de cruzamentos ao longo de oito minutos.**

Grupos experimentais			
Tempo	SAL (10)	NM (10)	PKU (8)
0-2 min	29,0+/-7,30	29,9+/-5,71	21,13+/-9,43
2-4 min	24,6+/-8,48	32,9+/-10,49	21,75+/-12,52
4-6 min	27,6+/-17,01	26,2+/-10,36	26,88+/-7,06
6-8 min	24,1+/-14,84	21,6+/-10,41	20,75+/-7,67

Resultados expressos em média +/- desvio-padrão; entre parênteses, o número de animais.

\*Não existe diferença significativa entre o número de cruzamento para os diferentes grupos ( $F(3,75) = 2,17; p > 0,09$ ). Não houve diferença na interação entre os grupos ao longo do tempo ( $F(6,75) = 1,58; p > 0,15$ ).

Os níveis de imunorreatividade tipo  $\beta$ -endorfina hipotalâmicos não apresentaram diferença em relação ao sexo do animal ( $F(5,32)=2,078$ ;  $p = 0,154$ ). Consoante à literatura consultada, a imunorreatividade tipo  $\beta$ -endorfina foi afetada pelo tratamento e pela exposição à novidade, como se pode observar na Tabela 4.1.5. ( $F(5,32)=5,056$ ;  $p < 0,01$ )

Nos grupos controle (SAL e NM), os níveis iniciais de imunorreatividade tipo  $\beta$ -endorfina foram similares ( $F(3,26)=2,326$ ;  $p = 0,114$ ), mas apresentaram redução significativa após a exposição à novidade ( $F(3,26)=12,859$ ;  $p < 0,001$ ).

Nos ratos do modelo animal de PKU, o nível inicial de imunorreatividade tipo  $\beta$ -endorfina foi semelhante ao dos controles, mas não sofreu redução significativa após a exposição à novidade, possivelmente indicando uma ausência de liberação cerebral de endorfinas.

Considerando todos os tratamentos, a análise de variância de duas vias não evidenciou diferença entre os tratamentos, mas houve interação significativa entre treino e tratamento. O teste de Duncan mostrou que, para um nível de significância de  $p < 0,01$ , o grupo PKU com treino é diferente do controle NM com treino. Para  $p < 0,05$ , PKU com treino difere de ambos os grupos NM e SAL com treino; PKU sem exposição à novidade não difere de ambos os grupos NM e SAL sem exposição à novidade.

A Tabela 4.1.5. apresenta os resultados da imunorreatividade tipo  $\beta$ -endorfina nos diferentes grupos de tratamento, com e sem habituação ao campo aberto, expressos em ng totais por animal.

**Tabela 4.1.4. Resultados da imunorreatividade tipo  $\beta$ -endorfina no hipotálamo de ratos PKU e controles, com ou sem exposição à novidade.**

Grupo	Exposição à novidade	Imunorreatividade tipo $\beta$ -endorfina	(n)
PKU	ausente	415,67 +/- 176,43	(6)
	presente	388,40 +/- 34,11 <sup>b</sup>	(5)
SAL	ausente	439,25 +/- 114,54	(4)
	presente	234,71 +/- 109,59 <sup>a</sup>	(7)
NM	ausente	418,63 +/- 130,53	(8)
	presente	210,88 +/- 81,80 <sup>a</sup>	(8)

Resultados expressos em média +/- desvio-padrão; entre parênteses, o número de animais.

a)  $p < 0,05$  em relação ao grupo sem exposição à novidade.

b)  $p < 0,001$  em relação aos grupos SAL e NM expostos à novidade (teste de Duncan).

## **4.2. SEGUNDO GRUPO EXPERIMENTAL: comparação dos testes de comportamento entre os animais hiperfenilalaninêmicos e controles; análise da resposta à injeção intra-peritoneal de beta-endorfina murina.**

Os animais pertencentes ao segundo grupo experimental não apresentaram diferenças significativas em sua distribuição para o tratamento crônico, quanto ao sexo (Qui quadrado= 0,0193;  $p = 0,889$ ) e peso corporal (g) ( $F=0,1685$ ;  $p = 0,682$ ) verificado aos 90 dias, entre o modelo animal de PKU e os controles.

Em relação à distribuição dos animais para o tratamento agudo, também não houve diferença em relação ao sexo (Qui-quadrado = 0,5739;  $p = 0,751$ ) e peso dos animais ( $F = 0,7476$ ;  $p = 0,478$ ).

A Tabela 4.2.1. apresenta os dados referentes à distribuição, número de ratos e peso médio dos animais, para o tratamento crônico inicial (PKU e SAL) e para o tratamento subsequente com SAL ou BETA, conforme descrito no item 3 (Material e métodos).

Observou-se que os animais apresentaram aproximadamente o mesmo número inicial de respostas de orientação, sendo que o grupo injetado cronicamente com salina mostrou, no teste, uma redução significativa no número de respostas de orientação realizadas no treino.

O grupo injetado cronicamente com o modelo experimental de PKU apresentou esta redução em nível significativo somente quando recebeu  $\beta$ -endorfina murina imediatamente após o treino e solução salina a 0,85% 6 minutos antes do teste.

**Tabela 4.2.1. Distribuição e peso médio dos animais de acordo com o tratamento crônico (PHE ou SAL) e agudo (SAL-SAL, BETA-SAL ou BETA-BETA).**

	Machos	Fêmeas	Peso
<b>Tratamento crônico</b>			
SAL	19	14	297.8 +/- 19,04
PHE	16	15	295.7 +/- 20,07
<b>Tratamento agudo</b>			
SAL-SAL	13	9	298,7 +/- 15,06
BETA-SAL	11	9	298,8 +/- 20,07
BETA-BETA	11	11	292,2 +/- 23,19

Resultados expressos em média +/- desvio-padrão; entre parênteses, o número de animais.

\*Não houve diferença significativa na distribuição entre os grupos.

A Tabela 4.2.2. apresenta o número médio de respostas de orientação no treino e teste do segundo experimento. A Tabela 4.2.3 mostra os valores de F de efeito simples, e a Tabela 4.2.4. apresenta o F de interação para estes mesmos dados.

**Tabela 4.2.2. Número médio de respostas de orientação verificadas no treino e teste, entre os grupos do segundo experimento**

Tratamento agudo	Tratamento crônico			
	SAL		PKU	
	Treino	Teste	Treino	Teste
SAL-SAL	15,5 +/- 2,4	9,9* +/- 2,7	15,2 +/-2,6	13,9 +/- 4,1
BETA-SAL	14,4 +/- 2,0	7,7* +/- 2,2	16,2 +/- 2,7	12,6* +/- 1,6
BETA-BETA	12,9 +/- 1,9	7,8* +/- 2,6	12,2 +/- 2,9	12,8 +/- 2,7

Resultados expressos em média +/- desvio-padrão

\*Existe diferença significativa entre os grupos quanto às respostas de orientação, para  $p < 0,001$  (Ver Tabela 4.2.3. - F de efeito simples para a resposta de orientação entre os grupos do segundo experimento)

\*Existe diferença na interação entre as respostas de orientação, para os diferentes grupos (Ver Tabela 4.2.4. - F de interação para a resposta de orientação entre os grupos do segundo experimento)

**Tabela 4.2.3. F de efeito simples para a resposta de orientação, entre os grupos do segundo experimento**

Tratamento agudo	Tratamento crônico	
	SAL	PKU
SAL-SAL	49,614*	2,53
BETA-SAL	68,83*	17,18*
BETA-BETA	40,50*	0,63

\*Significativos para  $p < 0,001$ .

**Tabela 4.2.4 Valores de F de interação para as respostas de orientação entre os diferentes grupos do segundo experimento.**

		F(1,16)					
		SAL			PKU		
		S-S	B-S	B-B	S-S	B-S	B-B
	S-S	/	/	/	/	/	/
SAL	B-S	0,783	/	/	/	/	/
	B-B	0,232	1,870	/	/	/	/
	S-S	14,87*	<b>22,48</b>	11,39*	/	/	/
PKU	B-S	2,73	6,21**	1,43	4,02	/	/
	B-B	<b>30,73</b>	<b>41,33</b>	<b>25,62</b>	2,85	13,01*	/

Os números em negrito são significativos para  $p < 0,001$ .

Os números seguidos de um asterisco são significativos para  $p < 0,01$ .

O número seguido de dois asteriscos é significativo para  $p < 0,05$ .

O número de cruzamentos, analisado por ANOVA com teste F de efeito simples e F de interação apresentou diferença significativa entre o treino e teste em dois grupos, o que não foi evidenciado no experimento anterior e difere dos dados da literatura, que indicam que o componente motor não é alterado nos modelos animais de PKU ( $F(5,58) = 3,076; p < 0,05$ ).

A Tabela 4.2.5. apresenta o número médio de cruzamentos do segundo experimento, com os respectivos valores para o teste F de efeito simples. A Tabela 4.2.6. mostra os valores do teste F de efeito simples, e a Tabela 4.2.7, o teste F de interação destes mesmos grupos.

Analisando-se o número de atividades de limpeza e bolos fecais, através da ANOVA de uma via com teste de Kruskal-Wallis, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (dados não mostrados).

**Tabela 4.2.5. Número médio de cruzamentos verificados no treino e teste, entre os grupos do segundo experimento.**

Tratamento agudo	Tratamento crônico			
	SAL		PKU	
	Treino	Teste	Treino	Teste
SAL-SAL	37,4 +/- 5,02	27,2* +/- 5,40	35,1 +/- 8,61	31,5 +/- 8,06
BETA-SAL	31,0 +/- 4,73	25,3* +/- 4,90	36,9 +/- 5,28	30,6* +/- 3,36
BETA-BETA	33,5 +/- 6,10	25,9* +/- 3,01	33,8 +/- 5,04	30,7 +/- 4,69

Resultados expressos em média +/- desvio-padrão

\*Existe diferença significativa entre os grupos quanto ao número de cruzamentos, para  $p < 0,05$  (Ver Tabela 4.2.6. - F de efeito simples para o número de cruzamentos entre os grupos do segundo experimento)

\*Existe diferença na interação entre o número de cruzamentos, para dois grupos (Ver Tabela 4.2.7. - F de interação para o número de cruzamentos entre os grupos do segundo experimento)

**Tabela 4.2.6. F de efeito simples para o número de cruzamentos, entre os grupos do segundo experimento**

Tratamento agudo	Tratamento crônico	
	SAL	PKU
SAL-SAL	26,26*	3,18
BETA-SAL	8,31*	8,31*
BETA-BETA	14,42*	2,42

\*Significativos para  $p < 0,05$ .

**Tabela 4.2.7. Valores de F de interação para o número de cruzamentos, entre os diferentes grupos do segundo experimento.**

		F(1,16)					
		SAL			PKU		
		S-S	B-S	B-B	S-S	B-S	B-B
	S-S	/	/	/	/	/	/
SAL	B-S	2,51	/	/	/	/	/
	B-B	0,88	0,42	/	/	/	/
	S-S	<b>5,58*</b>	0,60	2,03	/	/	/
PKU	B-S	1,69	0,04	0,17	<b>0,88</b>	/	/
	B-B	<b>6,37*</b>	0,88	2,51	0,03	1,20	/

\*Significativo para  $p < 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

Inicialmente, quanto ao tipo de modelo experimental de PKU utilizado neste trabalho (injeção de uma dose de Phe de 12 em 12 horas, calculada de acordo com a idade do animal, e injeção diária de um inibidor da fenilalanina hidroxilase, mePhe) pode-se dizer que o mesmo atingiu os objetivos esperados. Isto é, permitiu a manutenção de níveis elevados de fenilalaninemia (Castilhos, 1986; Lane et al., 1980) sem produzir parafefeitos significativos. Não ocorreu alteração significativa do peso corporal, cerebral e hipotalâmico dos animais.

É importante destacar que, até a conclusão deste trabalho, não existia nenhum modelo animal comercialmente disponível mais adequado ao estudo da PKU humana. Com a descoberta de uma variedade de ratos mutantes com deficiência de PAH (McDonald et al., 1990), denominada HPHG-5, muitos, senão todos, os estudos realizados em modelos experimentais de PKU terão de ser validados através de experimentos com esse tipo de animal, o qual se aproxima bem mais da PKU humana.

Entretanto, o fato de não se observarem parafefeitos grosseiros no modelo ora utilizado permite supor que os resultados obtidos até agora com o modelo bioquímico de administração de Phe e mePhe serão úteis para a compreensão da doença em seres humanos.

Outro aspecto a ser considerado é a variabilidade da resposta comportamental entre as espécies e, dentro destas, entre as diferentes linhagens de animais; em segundo lugar, a variabilidade dos subtipos de receptores opióides e da sua distribuição, nas diferentes linhagens e

espécies (Izquierdo, 1991; McDonald et al., 1990). A utilização de clones dos ratos HPHG-5 permitirá minimizar este problema.

Um aspecto relevante quanto ao modelo experimental de PKU utilizado refere-se à efetiva produção de um déficit de aprendizado e memória nestes animais, evidenciado pela ausência de uma diminuição (que poderíamos chamar "fisiológica" ) no número de respostas de orientação dos ratos PKU. Como já foi dito anteriormente, um dos sintomas mais problemáticos na PKU em seres humanos é o retardo mental progressivo e incapacitante, cujas causas ainda estão sob investigação (Scriver, 1991; Scriver et al., 1988).

Assim, é importante que o modelo experimental evidencie sinais de alterações do desenvolvimento neuro-psicomotor, um dos quais é o déficit de aprendizado e memória. Este modelo (Phe + mPhe) mostra-se particularmente útil, pois não provoca desnutrição, permitindo separar o componente nutricional global do rato da lesão neurológica. Obviamente não se está considerando aqui a nutrição cerebral, a qual está afetada tanto pela alteração compensatória do sistema de transporte de aminoácidos neutros da barreira hemato-encefálica que se segue à indução de hiperfenilalaninemia, quanto pela redução da síntese protéica cerebral (Brass et al., 1982; Ratzmann et al., 1984).

Nesse aspecto, o uso de um tratamento crônico mostra-se mais eficaz que o tratamento agudo em induzir alterações no aprendizado e memória, de acordo com estudos anteriores realizados neste laboratório (Castilhos, 1986; Pedron, 1993 [dados não publicados]). Possivelmente isto se deva ao efeito da hiperfenilalaninemia crônica sobre um estágio crucial da mielinização e proliferação glial (Hommes, 1991), que

ocorrem com maior intensidade no mesmo período em que se realiza este tratamento.

O cérebro de um rato recém-nascido corresponde, quanto à maturação, aproximadamente ao de um feto humano com 18 semanas de gestação; aos 25 dias de vida, o cérebro do rato é comparável ao de uma criança de 8 anos de idade (Del Valle et al., 1978). Assim, o tratamento crônico dos 6 aos 28 dias de vida corresponde grosseiramente à PKU em uma criança do nascimento até cerca de 8-10 anos, permitindo inferências sobre os efeitos da Phe sobre o ápice da mielinização e maturação glial. O uso de uma dose matinal de inibidor da PAH, associado à injeção de Phe duas vezes ao dia, também permite simular melhor a PKU, mantendo uma concentração de Phe mais uniforme ao longo do dia e não permitindo maior elevação dos níveis de tirosina.

Izquierdo, em 1991, realizou uma ampla revisão sobre o papel dos opióides endógenos na memória. Segundo o autor, o uso de tarefas aversivas para demonstrar retenção não é plenamente satisfatório pois, por vezes, não se pode distinguir entre o efeito da droga sobre a memória e o efeito da tarefa em si. Doses muito elevadas ou tóxicas da droga (possivelmente aversivas) também não estariam indicadas. Segundo Strupp (1984), as tarefas não-aversivas são as mais indicadas para a avaliação de alterações comportamentais discretas, como as verificadas nos EIM.

Em seres humanos, um achado recente de grande importância para a análise deste estudo é a constatação, por Bach et al. (1991) de uma correlação linear altamente significativa entre as concentrações líquóricas de fenilalanina e beta-endorfina, em

pacientes com PKU. Isto foi possível com o desenvolvimento de um anticorpo contra a cadeia terminal da beta-endorfina, altamente específico, e com a eliminação da beta-lipotrofina durante o processamento. Estes autores associam este achado à maior analgesia encontrada em pacientes com PKU em relação aos controles.

Vários autores relatam que a injeção de beta-endorfina antes ou imediatamente após o treino dificulta a retenção; entretanto, este efeito depende do tempo decorrido até a injeção e dose utilizada. A beta-endorfina possui uma curva de dose-resposta em U invertido, perdendo seu efeito à medida que a dose aumenta.

A administração de beta-endorfina ou exposição à novidade antes do teste produziria um aumento da evocação, reversível com naloxone ou naltrexone, indicando o surgimento de um tipo de dependência de estado. Nos animais tratados com beta-endorfina pós-treino, a dependência seria mais intensa, e assim, mais difícil de superar com tratamentos pré-teste (Izquierdo, 1991).

No presente trabalho, foi utilizada uma tarefa não-aversiva, a habituação ao campo aberto. Esta tarefa requer dois tipos de resposta: emocional e exploratória. A primeira (que abrange a contagem de bolos fecais e a timidez [esta última não avaliada neste estudo]) depende do sistema nervoso autônomo, e não envolve aprendizado/memória. Já a resposta exploratória ou de orientação pressupõe uma relação com o aprendizado/ memória, uma vez que o animal novamente exposto a um ambiente ou situação que já conhece usualmente diminui o número de respostas de orientação emitidas face a esta situação ou ambiente (Archer, 1973).

No primeiro experimento, em que todos os animais seriam sacrificados, utilizou-se a habituação ao campo aberto como novidade, para verificar a imunorreatividade tipo beta-endorfina no hipotálamo. Ao mesmo tempo, procurou-se realizar um "teste dentro do treino", isto é, os animais foram mantidos na caixa de habituação ao campo aberto por oito minutos, sendo registrados os valores das respostas de orientação e respostas emocionais em intervalos de dois minutos (0-2 min, 2-4 min, 4-6 min e 6-8 min). Assim, obteve-se um parâmetro para comparar a atividade inicial dos ratos e a curva esperada de declínio ao longo do tempo.

Verificou-se que os grupos apresentam um declínio nas respostas de orientação ao longo do tempo, e este declínio é diferente para os vários grupos. Este declínio, nos grupos controle, acompanhou-se da redução da imunorreatividade tipo beta-endorfina hipotalâmica, o que não ocorreu nos ratos PKU. Neste primeiro experimento, não se observaram diferenças significativas entre os grupos quanto ao número de cruzamentos, atividades de limpeza e defecação.

A atividade locomotora, expressa em número de cruzamentos, apresenta maiores dificuldades de avaliação como parâmetro de aprendizado/memória. Vários autores (Anderson, 1938; Paré, 1964; Ivinskis, 1970; Nancy et al., 1970 [citados por Pedron, 1992]) referem que ela apresenta um decréscimo ao longo de vários dias consecutivos. Entretanto, outros observam um aumento seguido de uma redução no número de cruzamentos ao longo do tempo (Stretch, 1960; Howarth, 1962 [citados por Pedron, 1992]).

Segundo Snodgrass (1974), a L-fenilalanina não provoca um aumento na atividade motora dos animais; porém, em altas

concentrações, provoca um decréscimo pequeno porém reprodutível na atividade motora. Foi o que se observou neste trabalho, no segundo experimento. Neste, os ratos foram submetidos a um treino na caixa de habituação ao campo aberto e, 24 horas após, a um teste.

Assim como no primeiro experimento, neste também se observou um decréscimo do número de respostas de orientação do treino para o teste, no grupo controle. O grupo PKU apresentou um desvio-padrão muito elevado; entretanto, observou-se que a redução usual nas respostas de orientação, esperada no teste, não ocorreu no grupo PKU.

No segundo experimento, foi observada uma diferença significativa entre os grupos quanto ao número de cruzamentos, em oposição ao experimento anterior. Pode-se observar que o grupo PKU apresenta um número médio de cruzamentos inicial maior no treino, o qual sofre um decréscimo relativamente pequeno no teste, transmitindo uma impressão de dificuldade de retenção já nos dois minutos iniciais de exposição. Aparentemente, o grupo PKU BETA-SAL, isto é, tratado cronicamente com Phe e mePhe e recebendo agudamente beta-endorfina murina imediatamente após o treino e salina antes do teste, foi o único que se comportou de modo semelhante aos controles.

Kovacs & de Wied (1981) observam que as endorfinas podem ter alguma ação sobre o sistema locomotor, a qual, em doses elevadas, produziria resultados controversos. Veith et al., em 1978 (citado por Kovacs & de Wied, 1981) relatou um aumento da atividade locomotora na habituação ao campo aberto. Porém, o mesmo grupo de pesquisas, em 1979, observou com uma dose ligeiramente menor um decréscimo na atividade locomotora dos animais. Este seria mais um fator de

confusão, podendo levar a conclusões errôneas sobre o comportamento em campo aberto.

Segundo Izquierdo (1991), doses relativamente elevadas de beta-endorfinas poderiam produzir um efeito amnésico real além da indução de uma dependência de estado (a qual, neste experimento, não parece ter ocorrido). Neste experimento, a repetição da dose de beta-endorfina antes do teste não reverteu o efeito amnésico apresentado pelos ratos PKU. Todavia, utilizou-se beta-endorfina murina, nas mesmas doses preconizadas por outros autores em trabalhos prévios para a beta-endorfina humana (Netto, 1985).

Por conseguinte, a dose utilizada neste estudo pode ter sido exagerada; a reexposição à dose elevada apenas 24 horas após poderia causar um acúmulo da droga no SNC dos ratos, levando ao efeito amnésico descrito por Izquierdo (1991).

Contudo, a administração de beta-endorfina somente após o treino, seguida de salina antes do teste, aparentemente produziu uma reversão da amnésia, diferentemente do grupo PKU SAL-SAL, onde a amnésia se manteve. Além disso, a ausência de uma redução no conteúdo hipotalâmico de beta-endorfina nos ratos PKU, no experimento inicial, aponta para um possível comprometimento do sistema opióide endógeno em sua origem, seja por redução na produção ou falha na liberação em resposta à novidade.

Vale lembrar que o anticorpo para medida de imunorreatividade tipo beta-endorfina apresenta reatividade cruzada com a beta-lipotropina (50%), alfa-endorfina (<0,01%), leucina encefalina (<0,004%), metionina encefalina (<0,004%) e alfa-MSH (<0,01%) (dados fornecidos pelo fabricante do kit de radioimunensaio- Dupont-NEN). Assim, a possibilidade de alteração na fração beta-lipotropina, que produz a reatividade cruzada mais significativa, não pode ser descartada, até que seja desenvolvido um anticorpo com maior especificidade.

Finalizando, os dados indicam um comprometimento do sistema endorfinico do rato em algum nível, não determinado, no modelo experimental de PKU. É difícil avaliar a importância destes achados para a apreciação das alterações de memória em geral; sem dúvida, porém, este é mais um elemento contribuinte ao déficit de aprendizado e memória na PKU, o qual necessita de investigação e validação subsequente, através de técnicas mais avançadas e de um modelo animal natural de PKU.

## CONCLUSÕES

Quanto ao primeiro experimento, conclui-se que o modelo experimental de PKU utilizado neste estudo, com doses crescentes de fenilalanina de acordo com a idade do animal, não produz alterações no peso corporal, peso cerebral e peso do hipotálamo.

O grupo PKU apresentou déficit de aprendizado/memória, aferidos através da diferença entre o número de respostas de orientação ao longo de oito minutos. Entretanto, não houve diferença ao longo do tempo entre os grupos PKU, SAL e NM na atividade motora (número de cruzamentos) e nível de estresse dos animais.

Em relação à imunorreatividade tipo beta-endorfina hipotalâmica, o nível inicial dos grupos foi semelhante, mas o grupo PKU não sofreu redução significativa após a exposição à novidade, presumivelmente por falta de liberação pelo SNC.

Quanto ao segundo experimento, observou-se que os ratos pertencentes ao modelo experimental de PKU também apresentaram déficit de aprendizado/memória, aferidos através da ausência de redução nas respostas de orientação do treino para o teste. Esta situação foi revertida no grupo que recebeu beta-endorfina murina imediatamente após o treino.

Além disso, neste experimento, houve diferença significativa entre os grupos, quanto ao número de cruzamentos realizados no treino e teste. O grau de estresse dos animais não apresentou diferenças significativas entre os grupos.

Finalizando, pode-se dizer que os ratos tratados com este modelo experimental de PKU apresentaram um déficit de aprendizado e memória, o qual possivelmente envolve alterações no sistema de opióides endógenos do tipo beta-endorfina, uma vez que apresenta distúrbios na concentração hipotalâmica dos mesmos e é parcialmente revertido com a administração de beta-endorfina murina.

Entretanto, devido à grande variabilidade dos achados comportamentais entre os animais e às dificuldades técnicas reveladas no decorrer do presente estudo (principalmente no que tange ao tipo de anticorpo utilizado na técnica de radioimunoensaio), acreditamos serem necessárias investigações subsequentes para a confirmação destes achados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, R. et alii - Retention of a passive avoidance response as a function of the intensity and duration of electric shock. *Psychonomic Science* 26: 125-128, 1972; citado por Kovacs G.L. & de Wied D., 1981.

ALESSIO, L. et alii - Age-related changes of methionine-enkephalin and beta-endorphin/ beta-lipotropin immunoreactivity in human CSF. *Life Sci* 43:1545-1550, 1988.

ALEXOPOULOS, G.S. et alii - Plasma immunoreactive  $\beta$ -endorphin levels in depression. Effect of electroconvulsive therapy. *Arch Gen Psychiatry* 40: 181-183, 1983.

ARCHER, J. - Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav*, 21:205-235, 1973.

ATKINSON, J.H. et alii - Plasma measures of beta-endorphin/ beta-lipotropin-like immunoreactivity in chronic pain syndrome and psychiatric subjects. *Psychiatry Research* 9: 319-327, 1983.

AUSTEN, B.M. et alii -  $\gamma$ -endorphin,  $\alpha$ -endorphin and met-enkephalin are formed extracellularly from lipotropin C-fragment. *Nature* 269: 619-621, 1977; citado por Kovacs G.L. & de Wied D., 1981.

BACH, F.W. et alii - Correlation between cerebrospinal fluid phenylalanine and beta-endorphin in patients with phenylketonuria. *Neurosci Lett* 129(1):131-133, 1991.

- BAÑOS, G. et alii - Inhibition of entry of some amino acids into the brain with observations on mental retardation in the amino acidurias. *Psychol Med* 4:262-270, 1977. Citado por HOMMES, 1989.
- BARRANGER, J.A. et al. - Isozymes of Phenylalanine Hydroxylase. *Science* 175:903-905, 1972.
- BENAVIDES, J. et alii - Effect of phenylalanine metabolites on the activities of enzymes of ketone-body utilization in brain of suckling rats. *Biochem J* 160: 217-222, 1976.
- BERGER, P.A. et alii - Investigating opioid peptides in schizophrenia and depression. In: *Neuropeptides in neurological and psychiatric disease*, editado por J.B. Martin e J.D. Batchas. Raven Press, New York, pág.309-333, 1986.
- BERGER, R. et alii - Brain protein and myelin metabolism in hyperphenylalaninemic rats. *Cellular & Molecular Biology* 26:31-36, 1980.
- BERRY, H. K. et alii - Reduction of cerebrospinal fluid phenylalanine after oral administration of valine, isoleucine and leucine. *Pediatr Res* 16:751-755, 1982. Citado por HOMMES, 1989.
- BERRY, H.K. et alii - Preliminary support for the oral administration of valine, isoleucine and leucine for phenylketonuria. *Dev Med Child Neurol* 27:33-39, 1985. Citado por HOMMES, 1989.
- BICKEL H. - Early Diagnosis and Treatment of Inborn Errors of Metabolism. *Enzyme* 38:14-26, 1987.
- BLASZCZYNSKI, A.P. & WINTER, S.W. - Editorial comment: Endorphins and psychiatry. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry* 18:111-112, 1984.

BRASS C.A. et alii - The effects of hypophenylalaninemia on fetal development: a new animal model of maternal phenylketonuria. *Pediatr Res* 16:388-394, 1982. Citado por McCHESNEY, 1988.

CASTILHOS Z.C. - Efeitos da hiperfenilalaninemia aguda sobre parâmetros comportamentais do rato. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Tese de Mestrado no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, U.F.R.G.S., 1986.

CHASE HP et al. - Effects of excess phenylalanine and of other amino acids on brain development in infant rats. *Pediatr Res* 4:96-102, 1970.

CHAVES E.C. - Detection of inherited neurometabolic disorders. A practical clinical approach. *Pediatr Clin North Am* 39(4):801-820, 1992.

COCKBURN F. & GITZELMANN R. (editores) - Inborn Errors of Metabolism in Humans. MTP Press Ltd., Lancaster, Inglaterra, 1982, páginas 90-99.

CREEL D. et alii - Pattern of evoked potentials in phenylketonuria. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 53:220-223, 1982, citado por HOMMES, F.A., em 1991.

DAVIDSON A. - Management and counseling of children with inherited metabolic disorders. *J Pediatr Health Care* 6(3): 146-152, 1992.

De KLOET E.R. & de WIED - The brain as target tissue for hormones of pituitary origin: Behavioral and biochemical studies. In: Martini L. & Ganong W.H. (eds.), *Frontiers in Neuroendocrinology*, pg. 157-201, New York, Raven Press, 1980; citado por Kovacs G.L. & de Wied D., 1981.

DEL VALLE J.A. et al. - Comparison of  $\alpha$ -methylphenylalanine and p-chlorophenylalanine as inducers of chronic hyperphenylalaninemia in developing rats. *Biochem J* 170:449, 1978.

De WIED, D. et alii - Behavioral and electrophysiological effects of peptides related to lipotropin ( $\beta$ -LPH). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 204:570-580, 1978; citado por Kovacs G.L. & de Wied D., 1981.

ELSAS, L.J. & TROTTER, J.F. - Changes in physiological concentrations of blood phenylalanine produce sensitive parameters of human brain function. In Wurtman, R.J. & Rittar-Walker, E. (editores) *Dietary Phenylalanine and Brain Function*, Birkhäuser, Boston, 1988, págs. 187-195. Citado por HOMMES, F.A., em 1989.

FAULL, K.F. et alii - Measurement of phenylacetic acid in cerebrospinal fluid and plasma using combined gas chromatography / electron capture chemical ionization mass spectrometry. *Biomed Environ Mass Spectrom* 17:213-219, 1988. Citado por HOMMES, 1991.

FRISCHKNECHT, H.R.; SIEGFRIED, B. & WASER, P.G. - A genetic approach to opioids and behavior. In: *Biological Psychiatry*, Ed. C. Shagass et alii., Elsevier, New York, pág. 37-39, 1985.

FULTON T.R. et al. - Phenylacetate and the enduring behavioral deficit in experimental phenylketonuria. *Life Sci* 27:1271-1281, 1980.

GALLAGHER, B.B. - The effect of phenylpyruvate on oxidative phosphorylation in brain mitochondria. *J Neurochem* 16:1071-1076, 1969.

GEISBERGEN, P.L.M; WIEGANT, V.M. & JONG, W. - Possible involvement of beta endorphin (1-31) and dinorphin (1-13) in the central hypotensive mechanism of action of alpha methyl dopa. *Neuroendocrinology* 49:71-79, 1989.

GIOVANINNI, M. et alii - Pattern reversal visual evoked potentials in phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 11:416-421, 1988, citado por HOMMES, F.A., em 1991.

GIUGLIANI, R. et alii - Current Trends in Infant Screening (Schimidt Benjamin Ed.). Excerta Medica, Amsterdam, pp. 167-171, 1989.

GREENGARD O. et al. -  $\alpha$ -methylphenylalanine, a new inducer of chronic hyperphenylalaninemia in suckling rats. *Science* 192:1007-1008, 1976.

HIRANO S. et al. - Effects of hyperphenylalaninemia in the fetal stage on the postnatal development of fetal rat brain. *Neurochem Res* 10(8): 1071-1081, 1985.

HOBBS J.R. - Displacement bone marrow transplantation for some inborn errors. *J Inherit Metab Dis* 13(4): 572-96, 1990.

HOMMES, F.A. - Myelin turnover at later stages of brain development in experimental hyperphenylalaninemia. In *Inherited Diseases of Amino Acid Metabolism* (Bickel H., Wachtel U., editores) Stuttgart: Thieme Verlag, 1985, págs. 67-85.

HOMMES F.A. - The role of the blood-brain barrier in the aetiology of permanent brain disfunction in hyperphenylalaninaemia. *J Inherit Metab Dis* 12: 41-46, 1989.

HOMMES, F.A. - Demyelination in hyperphenylalaninemia. In *Myelination and Dysmyelination* (Duncan ID, Skoff RP, Colman DR, editores); *Ann NY Acad Sci* 605:449-452, 1990.

- HOMMES F.A. - On the mechanism of permanent brain dysfunction in hyperphenylalaninemia. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* 46:277-287, 1991.
- HUETHER G. - Amino acid availability and brain development: effects of nutritional and metabolic inadequacies. *Eur J of Clin Nutrition* 43:19-25, 1989.
- HUGHES, J.V. & JOHNSON, T.C. - The effects of hyperphenylalaninaemia on the concentrations of aminoacyl-transfer ribonucleic acid *in vivo*. *Biochem. J.* 162:527-537, 1977.
- HUGHES, J.V. & JOHNSON, T.C. - The effects of phenylalanine on aminoacid metabolism and protein synthesis *in vitro*. *J Neurochem* 26:1105-1113, 1976, citado por HUETHER, G., 1989.
- ISAACS, C.E. & GREENGARD, O. - The effect of hyperphenylalaninemia on glycine metabolism in developing rat brain. *Biochem J* 192:441-448, 1980.
- IZQUIERDO, I. Effect of naloxone and morphin on various forms of memory in the rat: possible role of endogenous opiate mechanisms in memory consolidation. *Psychopharmacology*, 66:199-203, 1979.
- IZQUIERDO, I. ; DIAS, R.D.; SOUZA, D.O.; CARRASCO, M.A.; PERRY, M.L.S. & ELISABETSKY, E. The role of opioid peptides in memory and learning. *Behavioral Brain Research*, 1:451-68, 1980.
- IZQUIERDO, I.; SOUZA, D.O.; DIAS, R.D.; CARRASCO, M.A.; VOLKMER, N.; PERRY, M.L.S. & NETTO, C.A. - Effect of various behavioral training and testing procedures on brain  $\beta$ -endorphin-like immunoreactivity, and the possible role of  $\beta$ -endorphin in behavioral regulation. *Psychoneuroendocrinology*, 9: 381-9, 1984.

- IZQUIERDO, I. & NETTO, C.A. The role of  $\beta$ -endorphin in behavioral regulation. *Annals of the new York Academy of Sciences*, 444:162-77, 1985.
- IZQUIERDO, I. & NETTO, C.A. - The role of  $\beta$ -Endorphin in behavioral regulation. *Ann NY Acad Sci*, 444:162-77, 1985.
- IZQUIERDO, I. - Opioids and memory. In: *Aspects of Synaptic Transmission*, editado por T.W.Stone; Trevor & Francis, London, 1991.
- JARDIM, L.B. et alii - Resultados preliminares de um programa de detecção precoce para aminoacidopatias no Rio Grande do Sul. *Jornal de Pediatria*, 68(5):189-191, 1992.
- JERVIS, G.A. & DREIZA, E.J. - *Clin Chim Acta* 13:435, 1968.
- KOVACS, G.L. & de Wied D. - Endorphin Influences in Learning and Memory. In: *Endogenous Peptides and Learning and Memory Processes*, pg. 231-247, Academic Press, London, 1981.
- KRAUSE W. et. al. - Phenylalanine alters the main power frequency of electroencephalograms and plasma L-Dopa in treated patients with phenylketonuria. *Pediatr Res* 20:1112-1116, 1986.
- LANE J.D. et al. - Characterization of experimental phenylketonuria - Augmentation of hyperphenylalaninemia with  $\alpha$ - methylphenylalanine and p-chlorophenylalanine. *Biochim Biophys Acta* 627:144-156, 1980.
- LAND, J.M. & CLARK, J.B. - Effect of phenylpiruvate on enzymes involved in fatty acid synthesis in rat brain. *Biochem J* 134:545-555, 1973.
- LEDLEY F.D. - Clinical application of somatic gene therapy in inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 13(4):597-616, 1990.
- LIPTON M.A. et al. - p-Chlorophenylalanine-induced chemical manifestations of phenylketonuria in rats. *Science* 156: 248-250, 1967.

- LONDI A. et alii - Pattern-reversal visual evoked potentials in phenylketonuric children. *Childs Neuro Syst* 3:278-281, 1987, citado por HOMMES, F.A., em 1991.
- LOO Y.H. et al. - Vulnerability of the immature rat brain to phenylacetate intoxication: postnatal development of the detoxication mechanism. *J Neurochem* 32:1699-1705, 1979.
- LOO Y.H. et al. - Phenylacetate and brain disfunction in experimental phenylketonuria: synaptic development. *Life Sci* 27:1283-1290, 1980.
- LOO Y.H. et al. - biochemical explanation of phenyl acetate neurotoxicity in experimental phenylketonuria. *J Neurochem* 45:1596-1600, 1985.
- LOU H.C. - Large doses of tryptophan and tyrosine as potential therapeutic alternative to dietary phenylalanine restriction in phenylketonuria. *Lancet* 2:150-151, 1985.
- LOU H.C. et al. - Decreased vigilance and neurotransmitter synthesis after discontinuation of dietary treatment for phenylketonuria in adolescents. *Eur J Pediatr* 144(1): 17-20, 1985.
- LOU H.C. et al. - Increased vigilance and dopamine synthesis by large doses of tyrosine or phenylalanine restriction in phenylketonuria. *Acta Paediatr Scand* 76(4): 560-565, 1987.
- MATTHIES, H. - Neurobiological aspects of learning and memory. *Ann Rev Psychol* 40:381-404, 1989.
- McCHESNEY R. et al. - Phenylalanine uptake in neonatal and infant rat brain. *Biology of the Neonate* 54:275-284, 1988.
- McDONALD J.D., BODE V.C., DOVE, W.F. & SHEDLOWSKY A. - Pah<sup>hph-5</sup> : A mouse mutant deficient in phenylalanine hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1965-1967, 1990.

- NABER, D. et alii - Endogenous opioid activity and  $\beta$ -endorphin immunoreactivity in CSF of psychiatric patients and normal volunteers. *Am J Psychiatry* 138:1457-1461, 1981.
- NAPPI, C. et alii - Aging brain and dementias: changes in central opioids. *Eur Neurol* 28:217-220, 1988.
- NAPPI, C. et alii - Plasma  $\beta$ -endorphin levels in obese and non-obese patients with polycystic ovarian disease. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 30:151-156, 1989.
- NETTO, C.A. - O papel do sistema  $\beta$ -endorfinico cerebral na modulação da memória. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Tese de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da U.F.R.G.S., Porto Alegre, 1984.
- NETTO, C.A. - Efeitos da ativação do sistema  $\beta$ -endorfinico cerebral sobre a modulação da memória, a nocicepção e os níveis de aminas biogênicas cerebrais. Universidade do Paraná/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade do Paraná, em convênio com a U.F.R.G.S., Curitiba, 1987.
- NIELSEN, J.B.; BACH, F.W.; BUCHHOLT, J. & LOU, H. - Cerebrospinal fluid beta-endorphin in Rett syndrome. *Dev Med Child Neurol* 33(5):406-411, 1991.
- NIGAM, M.P. & LABAR, D.R. - The effect of hyperphenylalaninemia on size and density of synapses in rat neocortex. *Brain Res* 179:195-198, 1979.
- OKANO Y et al. - Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria. *N Engl J Med* 324: 1232-1238, 1991.

- OZAND P.T. & GASCON G.G. - Treatment of inherited neurometabolic diseases: the future. *J Child Neurol* 7:S132-40, 1992.
- OZAND P.T. - Avaluation of ... metabolic diseases at the King Faisal Specialist Hospital and Research Centre. *J Child Neurol* 7:S4-S11, 1992.
- PARDRIDGE W.M. & OLDENDORF W.H. - Kinetics of competitive inhibition of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier. *J Neurochem* 28:103, 1977, citado por COCKBURN & GITZELMANN, 1982.
- PARDRIDGE, W.M. - Brain Metabolism: A perspective from the blood-brain barrier. *Physiol Rev* 63:1481-1535, 1983.
- PARDRIDGE, W.M. - Phenylalanine transport at the human blood-brain barrier. In Wurtman RJ & Ritter-Walker, E., editores, *Dietary Phenylalanine and Brain Function*, Birkhäuser, Boston, 1988, pags. 55-62.
- PARDRIDGE W.M. & CHOI Th.D. - Neutral aminoacid transport at the human blood-brain barrier, *Fed Proc* 45:2073-2078, 1986., citado por HOMMES, 1989.
- PEARSEN, K.D. et alii - Phenylketonuria: MR imaging of the brain with clinical correlation. *Radiology* 177:437-440, 1990.
- PEDRON, C.G. - Efeito da administração de alanina a ratos submetidos a fenilcetonúria experimental pós-natal. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Tese de Mestrado no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, U.F.R.G.S., 1992.
- PERRY, T.L. - Urinary excretion of amines in phenylketonuria and mongolism. *Science* 6:879-880, 1962.

PRATT, O. E. - A new approach to the treatment of phenylketonuria. *J. Ment Def Res* 24:203-217, 1980.

PRATT, O.E. - The need of the brain for amino acids and how they are transported across the blood-brain barrier. In Belton, N.R. & Toothill, C. , editores, *Transport and Inherited Disease*, MTP Press, Boston, 1981, págs.87-122.

RATZMANN G.W et al. - On the brain barrier system function and changes of cerebrospinal fluid concentrations of phenylalanine and tyrosine in human phenylketonuria. *Biomed Biochim Acta* 43: 197-204, 1984.

REALMUTO G.M. et al. - Psychiatric Diagnosis and Behavioral Characteristics of Phenylketonuric Children. *J Nerv Ment Dis* 174(9): 536-540, 1986.

ROBAIN, O. et alii - Experimental phenylketonuria: effect of phenylacetate intoxication on number of synapses in the cerebellar cortex of the rat. *Acta Neuropathol (Berl)* 61:313-315, 1983.

SCRIVER, C.R., KAUFMAN, S. & WOO, S.L.C. - The hyperphenylalaninemias. In SCRIVER, C.R. et al. (editors): *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. Mc Graw-Hill, New York, 6th edition, pp. 495-546, 1989.

SHAH, S.N. et alii - Inhibition of sterol synthesis *in vitro* by metabolites of phenylalanine. *Biochim Biophys Acta* 187:236-242, 1969.

SLOWINSKA-SRZEDNICKA, J. et alii - Effect of clonidine on beta-endorphin, ACTH and cortisol secretion in essential hypertension and obesity. *Eur J Clin Pharmacol* 35:115-121, 1988.

SMITH, A.P. - The multiple site  $\beta$ -endorphin receptor. In: *Receptors again*. Editado por J.W.Lamble e A.C. Abbott, Elsevier Science Publisher, Oxford, págs. 229-232, 1984.

STRUPP, B.J. et alii - PKU, learning, and models of mental retardation. *Dev Psychobiol* 17:109-120, 1984.

SWAIMAN, K.F. & WU, S.R. - Phenylalanine and phenylacetate adversely affect developing mammalian brain neurons. *Neurology* 34:1246-1250, 1984.

TERENIUS, L. - Approaches to neuropeptide and, in particular, endorphin measurements. In: *Frontiers in Biochemical and Pharmacological Research in Depression*, editado por E.Usdin et alii, Raven Press, New York, pág. 35-43, 1984.

THOMPSON A.J. et. al. - Neurological deterioration in young adults with phenylketonuria. *Lancet* 336: 602-605, 1990.

TREFZ F.K. et al - Differential diagnosis and significance of various hyperphenylalaninemias; in Bickel, Wachtel, *Inherited diseases of amino acid metabolism*, p.86 (Thieme, Stuttgart, 1985); citado por H. Bickel, 1987.

VEITH, J.L. et alii - Systemic administration of the endorphins selectively alters open-field behavior of rats. *Physiology and Behavior*, 20: 539-542, 1978; citado por Kovacs G.L. & de Wied D., 1981.

VILLASANI D. et alii - Neurological deterioration in adult phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 12: 451-457, 1989, citado por HOMMES, F.A., em 1991.

WYNGAARDEN J.B. & SMITH L.H. Jr. (editores) - *Cecil Textbook of Medicine*, 18<sup>a</sup> edição, volume 1, pp.1155-1157, 1988.

WEN, G.Y. et alii - Neuropathology of phenylacetate poisoning in rats: an experimental model of phenylketonuria. *Ann Neurol* 7:557-566,1980.

WYSE, A.T.S. - Atividade da ATP-Difosfohidrolase (EC 3.6.1.5.) em fração sinaptossomal de córtex cerebral de ratos na fenilcetonúria experimental. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Tese de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da U.F.R.G.S., Porto Alegre, 1990.