

EFEITOS DA HIPERFENILALANINEMIA AGUDA SOBRE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS DO RATO

ZULEICA CARMEN CASTILHOS

Orientador: Prof. CLÓVIS MILTON DUVAL WANNMACHER

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas - Bioquímica - do Departamento de Bioquímica do Ins-
tituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, para a obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre - 1986

AGRADECIMENTOS

Ao Toni, meus pais, Chiquinho, Didi e demais familiares pela compreensão e apoio.

Ao grupo de pesquisa em Erros Inatos do Metabolismo pelo afeto e auxílio, em especial aos meus amigos Dudu, Janice e Moshe.

Ao Clóvis, meu querido Mestre e amigo, pela dedicada orientação.

Ao Alex, pela colaboração em várias etapas deste trabalho.

Aos monitores Ane Rose, Lilian, Gisele, Arlindo e Ana, pela amizade e assistência.

Ao Diogo, pela revisão e sugestões.

A todos os amigos do Departamento de Bioquímica pelo carinho recebido.

Ao CNPq e CAPES pelas bolsas concedidas.

RESUMO

Os modelos de hiperfenilalaninemia aguda permitem estudar as alterações imediatas provocadas por elevados níveis de fenilalanina no soro e cérebro de animais.

Hiperfenilalaninemia aguda foi induzida com injeções intraperitoneais de fenilalanina em ratos de 29 - 31 dias. 60 minutos após a administração ocorrem as maiores alterações nos níveis de fenilalanina, tirosina e triptofânio. Os animais hiperfenilalaninêmicos foram treinados e testados em esquiua ativa de 2 vias, esquiua inibitória e campo aberto, 60 minutos após a administração de fenilalanina ou salina, sendo que um intervalo de 24 horas separou treino e teste.

Em esquiua ativa de 2 vias com choque elétrico de 0,8 mA, tanto o grupo controle quanto o grupo hiperfenilalaninêmico evidenciaram diferenças significativas entre treino e teste. Entretanto, o aumento da atividade motora no teste, da mesma ordem que a resposta associativa, não permite afirmar que houve aprendizado da tarefa e, portanto, a esquiua ativa de 2 vias não se mostrou um teste adequado para o estudo de hiperfenilalaninemia em ratos adultos jovens.

Na esquiua inibitória foram utilizadas duas intensidades de choque elétrico, 0,2 mA e 0,3 mA, e os resultados suge-

rem que elevadas concentrações de fenilalanina no cérebro não afetam os processos da memória.

Os resultados em campo aberto indicam que hiperfenilalaninemia não interfere com a atividade motora nem com o comportamento exploratório dos animais, não afeta a evocação, mas altera a aquisição e/ou consolidação da memória nesta tarefa. Portanto, o campo aberto mostrou-se adequado para o estudo de hiperfenilalaninemia em ratos jovens de 29 - 31 dias de idade.

Contudo, sobrecarga de fenilalanina induz também elevação nos níveis cerebrais de tirosina. Como os pacientes fenilcetonúricos apresentam níveis normais ou diminuídos de tirosina, ratos de 29 - 31 dias foram injetados com fenilalanina e α -metilfenilalanina (inibidor da fenilalanina hidroxilase hepática). 60 minutos após a administração de salina ou de fenilalanina os ratos foram submetidos aos testes do campo aberto, o qual se mostrou o mais adequado.

Os resultados em campo aberto indicam que hiperfenilalaninemia não interfere com a atividade motora nem com o comportamento exploratório dos animais, não afeta a evocação, mas afeta a aquisição e/ou consolidação da memória nesta tarefa. Como os animais injetados somente com fenilalanina apresentam o mesmo desempenho nesta tarefa que os animais injetados com fenilalanina e o inibidor, os resultados sugerem que a hiperfenilalaninemia, e não as alterações nos níveis de tirosina, afetam o desempenho dos animais. Também a administração de propranolol (β -bloqueador) não modificou os efeitos da hiperfenilalaninemia, sugerindo que as alterações na aquisição e/ou consolidação independem da atividade das catecolaminas.

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO	1
1. Aspectos Bioquímicos	1
1.1. Metabolismo da Fenilalanina em Tecidos de Mamíferos.	1
1.2. Aspectos Estruturais da Fenilalanina Hidroxilase He- pática	8
2. Hiperfenilalaninemias Humanas	10
2.1. Classificação das Hiperfenilalaninemias	10
3. Fenilcetonúria	14
3.1. Histórico	14
3.2. Aspectos Clínicos	15
3.3. Alterações Estruturais e Bioquímicas	18
3.4. Modelos Animais de Fenilcetonúria	23
4. Aprendizado e Memória	34
5. Objetivos	36
MATERIAL E MÉTODOS	38
1. Animais Experimentais	38
2. Administração do Aminoácido	38
3. Tratamentos com Drogas	39
3.1. Administração de α -metil-D, L-fenilalanina	39
3.2. Administração de β -bloqueador Adrenérgico (Proprano- lol)	39
4. Coleta da Amostra	40
5. Dosagens	41
5.1. Dosagem de Fenilalanina	41
5.2. Dosagem de Tirosina	42
5.3. Dosagem de Triptofânio	43

	Página
5.4. Cálculo das Concentrações	44
6. Testes Comportamentais - Caracterização	45
6.1. Esquiva Ativa de 2 Vias	45
6.2. Esquiva Inibitória	46
6.3. Campo Aberto	47
7. Experimentos Realizados	48
7.1. Efeitos da Administração Intraperitoneal de Fenilalanina 4 g% em Salina nos Níveis Séricos e Cerebrais de Fenilalanina, Tirosina e Triptofânio	48
7.2. Efeitos da Administração Subcutânea de α -Metilfenilalanina 1,43 g% em Salina nos Níveis Séricos e Cerebrais de Fenilalanina, Tirosina e Triptofânio	48
7.3. Efeitos da Administração Subcutânea de α -Metilfenilalanina 1,43 g% em Salina e Intraperitoneal de Fenilalanina 3,6 g% em Salina nos Níveis Séricos e Cerebrais de Fenilalanina, Tirosina e Triptofânio	49
7.4. Efeitos da Administração Intraperitoneal de Fenilalanina 4 g% em Salina no Comportamento de Ratos em Esquiva Ativa de 2 Vias Submetidos a Choque Elétrico de 0,8 mA	49
7.4.1. Grupo Controle	49
7.4.2. Grupos Experimentais	49
7.5. Efeitos da Administração Intraperitoneal de Fenilalanina 4 g% em Salina no Comportamento de Ratos em Esquiva Inibitória Submetidos a Choque Elétrico de 0,3 mA	50
7.5.1. Grupos Controles	50
7.5.2. Grupos Experimentais	51
7.6. Efeitos da Administração Intraperitoneal de Fenilalanina 4 g% em Salina no Comportamento de Ratos em Esquiva Inibitória Submetidos a Choque Elétrico de 0,2 mA	51
7.7. Efeitos da Administração Intraperitoneal de Fenilalanina 4 g% em Salina Antes do Treino e Antes do Teste no Comportamento de Ratos em Campo Aberto	52
7.7.1. Grupo Controle	52

	Página
7.7.2. Grupo Experimentais	52
7.8. Efeitos da Administração Intraperitoneal de Fenilalanina 4 g% em Salina Após o Treino no Comportamento de Ratos em Campo Aberto	53
7.8.1. Grupo Controle	53
7.8.2. Grupo Experimental	53
7.9. Efeitos da Administração Subcutânea de α -Metilfenilalanina 1,43 g% em Salina e Intraperitoneal de Fenilalanina 3,6 g% em Salina Antes do Treino no Comportamento de Ratos em Campo Aberto	53
7.9.1. Grupo Controle	53
7.9.2. Grupos Experimentais	54
7.10. Efeitos da Administração Intraperitoneal de β -Bloqueador (Propranolol) e de Fenilalanina 4 g% em Salina Antes do Treino no Comportamento de Ratos em Campo Aberto	54
7.10.1. Grupo Controle	54
7.10.2. Grupos Experimentais	55
8. Análise Estatística	55
 RESULTADOS	 57
1. Dosagens	57
1.1. Efeitos da Administração Intraperitoneal de Fenilalanina 4 g% nos Níveis Séricos e Cerebrais de Fenilalanina, Tirosina e Triptofânio	57
1.2. Efeitos da Administração Subcutânea de α -Metilfenilalanina nos Níveis Séricos e Cerebrais de Fenilalanina, Tirosina e Triptofânio	60
1.3. Efeitos da Administração Subcutânea de α -Metilfenilalanina e Intraperitoneal de Fenilalanina 3,6 g% em Salina nos Níveis Séricos e Cerebrais de Fenilalanina, Tirosina e Triptofânio	61
2. Comportamento	64
2.1. Efeitos da Administração Intraperitoneal de Fenilalanina 4 g% em Salina no Comportamento de Ratos em Esquiva Ativa de 2 Vias Submetidos a Choque Elétrico de 0,8 mA	64

2.2. Efeitos da Administração Intraperitoneal de Fenilalanina 4 g% em Salina no Comportamento de Ratos em Esquiva Inibitória Submetidos a Choque Elétrico de 0,3 mA	70
2.3. Efeitos da Administração Intraperitoneal de Fenilalanina 4 g% em Salina no Comportamento de Ratos em Esquiva Inibitória Submetidos a Choque Elétrico de 0,2 mA	70
2.4. Efeitos da Administração Intraperitoneal de Fenilalanina 4 g% em Salina, Antes do Treino e Antes do Teste no Comportamento de Ratos em Campo Aberto	72
2.5. Efeitos da Administração Intraperitoneal de Fenilalanina 4 g% em Salina Após o Treino no Comportamento de Ratos em Campo Aberto	75
2.6. Efeitos da Administração Subcutânea de α -Metilfenilalanina 1,43 g% em Salina e Intraperitoneal de Fenilalanina 3,6 g% em Salina Antes do Treino no Comportamento de Ratos em Campo Aberto	77
2.7. Efeitos da Administração Intraperitoneal de β -bloqueador (Propranolol) e de Fenilalanina 4 g% em Salina Antes do Treino no Comportamento de Ratos em Campo Aberto	78
DISCUSSÃO	82
CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
APÊNDICE	115

INTRODUÇÃO

1. Aspectos Bioquímicos

1.1. Metabolismo da Fenilalanina em Tecidos de Mamíferos

Fenilalanina é um aminoácido essencial para a síntese protéica em tecidos de mamíferos (WOMACK & ROSE, 1934 - citado por TOURIAN & SIDBURY, 1983). A proporção de fenilalanina da dieta utilizada na síntese protéica varia com idade (SCRIVER & ROSEMBERG, 1973 - citado por TOURIAN & SIDBURY, 1983). A homeostase do "pool" de fenilalanina reflete a interação entre a dieta, "turnover" protéico e catabolismo. A hidroxilação na posição 4 do anel fenil (MOSS & SCHOENHEIMER, 1940), fisiologicamente é a via mais significativa da sua degradação (MOSS & SCHOENHEIMER, 1940 e GRAU & STEELE, 1954), formando tirosina. Em períodos com privação de tirosina na dieta, fenilalanina fornece quantidades adequadas de tirosina para sustentar o crescimento no rato (WOMACK & ROSE, 1934 - citado por TOURIAN & SIDBURY, 1983) e equilíbrio nitrogenado no homem (TALBERT & WATTS, 1963; BURRILL & SHUCK, 1964 - citados por MOLDAWER et alii, 1983). No mínimo, metade da fenilalanina ingerida normalmente é convertida

em tirosina a cada passagem pelo fígado (ELWYN, 1970 - citado por BENEDICT et alii, 1983). Em mamíferos, a hidroxilação da fenilalanina é limitada ao fígado, rins e pâncreas (TOURIAN et alii, 1969 - citado por TOURIAN & SIDBURY, 1983) e, em pouca extensão, ao cérebro (IKEDA et alii, 1965). Esta reação não é invertida nem mesmo quando há deficiência de fenilalanina, como por exemplo, em ratos com dieta restrita em fenilalanina (GRAU & STEELE, 1954).

A fenilalanina também segue vias catabólicas menores, formando fenilpiruvato, feniletilamina e outros metabólitos; todos em pequenas quantidades (RODWELL, 1983; KNOX, 1972) (Figura 1).

A reação de hidroxilação envolve os seguintes componentes: L- fenilalanina, fenilalanina hidroxilase, diidropteridina redutase, tetraidropteridina, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH), oxigênio, e um mecanismo de fosforilação - defosforilação (SCRIVER & CLOW, 1980a; UDENFRIEND & COOPER, 1952; KAUFMAN, 1958, 1963, 1967). A hidroxilação é estimulada "in vitro" por uma proteína estimuladora (PHS) e por lisolecitina, mas o papel destas substâncias "in vivo" ainda não é conhecido (SCRIVER & CLOW, 1980a; KAUFMAN & FISHER, 1970). O sistema completo de hidroxilação em seres humanos tem sido demonstrado inequivocamente somente em fígado (SCRIVER & CLOW, 1980a). UDENFRIEND & COOPER (1952) foram os primeiros pesquisadores a demonstrar a presença de atividade da fenilalanina hidroxilase em frações solúveis de fígado, a necessidade de oxigênio e nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) para a reação e a especificidade desta reação para L-fenilalanina.

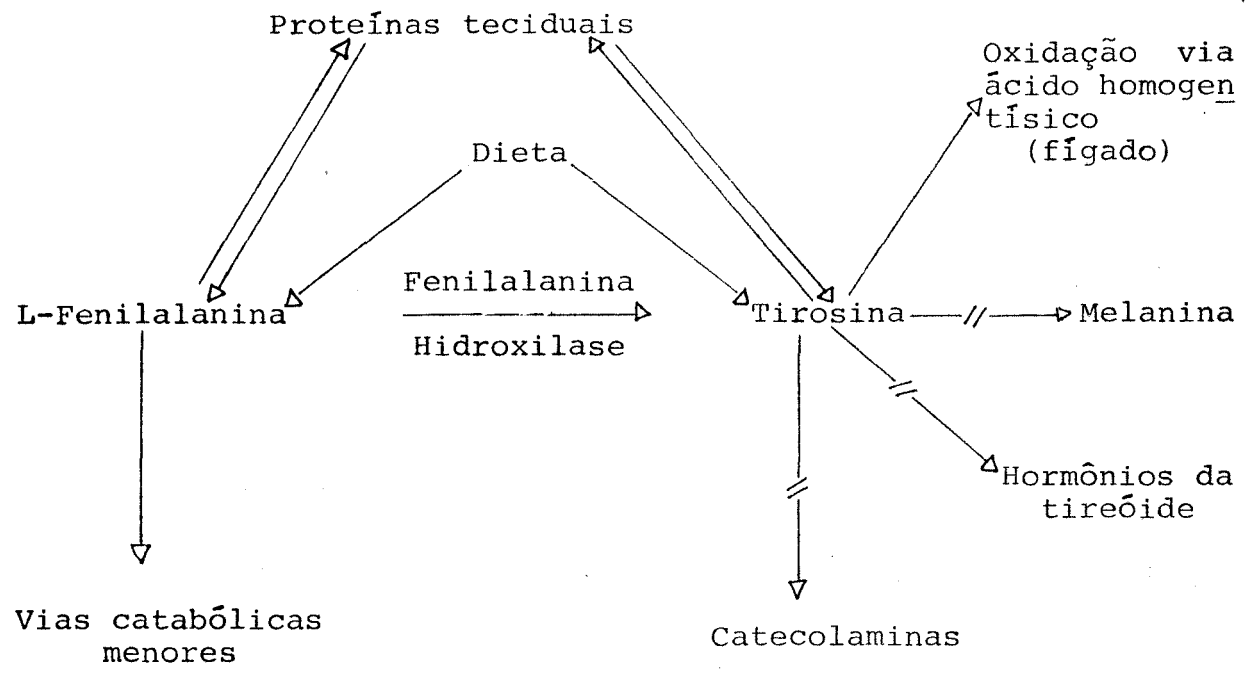


FIGURA 1. Fluxo metabólico da fenilalanina e tirosina.

Kaufman descreveu a estrutura do tetraidrobiopterina (BH_4) e desenvolveu suas transformações durante a reação de hidroxilação (KAUFMAN, 1958, 1963 e 1967).

A reação de hidroxilação da fenilalanina envolve quantidades estequiométricas de L-fenilalanina, tetraidrobiopterina e oxigênio; os produtos são tirosina, diidropteridina na forma quinonóide e água. O diidropteridina na forma quinonóide é convertido a tetraidrobiopterina pela diidropteridina redutase ou tautomeriza a 7-8, diidropteridina e, através da diidrofolato redutase, é reduzido a tetraidrobiopterina (Figura 2). O cofator existe predominante na sua forma ativa (reduzido) em extrato de fígado cru. Presumivelmente, em células hepáticas, a diidrofolato redutase deve funcionar, também, na síntese de biopterina a partir de GTP (guanosina trifosfato) (KAUFMAN, 1967); (BROWN, 1971; GAL, 1978 - citados por TOURIAN & SIDBURY, 1983).

A biopterina é cofator obrigatório na hidroxilação dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofânio (KAUFMAN, 1967; SHIMAN et alii, 1971; FRIEDMAN et alii, 1972) funcionando como doador de elétrons no sistema (SCRIVER & CLOW, 1980a). Tetraidrobiopterina e suas enzimas estão presentes também em tecidos extra-hepáticos, como o cérebro.

A hidroxilação deficiente leva ao acúmulo de fenilalanina no sangue e nos tecidos, ativando vias catabólicas secundárias com grande produção de metabólitos que são excretados na urina em quantidades excessivas. A fenilalanina pode originar fenilpiruvato por transaminação e feniletilamina por descarboxilação. A descarboxilação parece tornar-se a maior via metabólica quando os níveis de aminoácidos aromáticos estão elevados

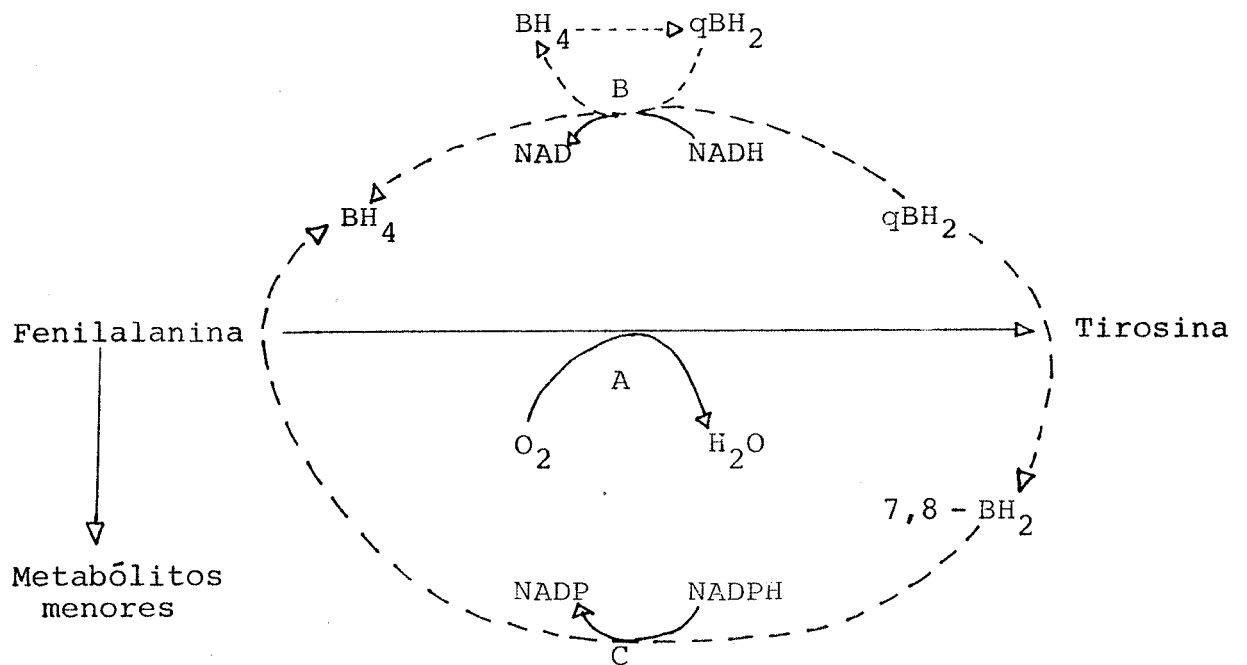


FIGURA 2. Reação de hidroxilação da fenilalanina.

A - representa Fenilalanina Hidroxilase; B - Dihidropteridina redutase; e C - Dihidrofolato redutase.
 As abreviações: BH₄ - tetraidrobiopterina; qBH₂ - dihidrobiopterina na forma quinonóide e em forma tautomérica - 7,8-BH₂; NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo; NADH - NAD reduzido; NADP - NAD fosfato; NADPH - NAD fosfato reduzido (SCRIVER & CLOW, 1980a).

(DAVID et alii, 1974). A feniletilamina origina o mandelato (EDWARDS & BLAU, 1972). O fenilpiruvato pode ser metabolizado a fenilacetato (DAVISON & SANDLER, 1958), a fenilactato (EDWARDS & BLAU, 1972) e a o-hidroxifenilacetato por ação da p-hidroxifenilpiruvato oxidase. No metabolismo da tirosina esta enzima atua sobre o p-hidroxifenilpiruvato formando ácido homogentísico. Fenilactato pode entrar diretamente no cérebro através da circulação periférica ou ser formado dentro do cérebro (EDWARDS & BLAU, 1972).

Em pacientes fenilcetonúricos, os níveis de fenilpiruvato encontram-se elevados (WALSER et alii, 1976 - citado por CONN & STEELE, 1982) no sangue e na urina. Este metabólito tem sido considerado como um dos fatores envolvidos na deterioração mental destes pacientes (BICKEL et alii, 1955 - citado por BICKIS et alii, 1957) e nas alterações estruturais e bioquímicas do tecido nervoso (SILBERBERG, 1967; WEBER, 1969). Entretanto, fenilpiruvato parece não atravessar a barreira cérebro - sangue em ratos adultos (CONN & STEELE, 1982). Portanto, se fenilpiruvato pode influenciar negativamente na função cerebral normal, o aumento de seus níveis no cérebro devem se dar por transaminação local de fenilalanina (CONN & STEELE, 1982) ou por permeabilidade da barreira cérebro - sangue imatura em feto ou recém-nascido. BRAND (1981) verificou em fatias de tecido cerebral que o fenilpiruvato era preferencialmente transaminado a fenilalanina do que descarboxilado a fenilacetato (Figura 3).

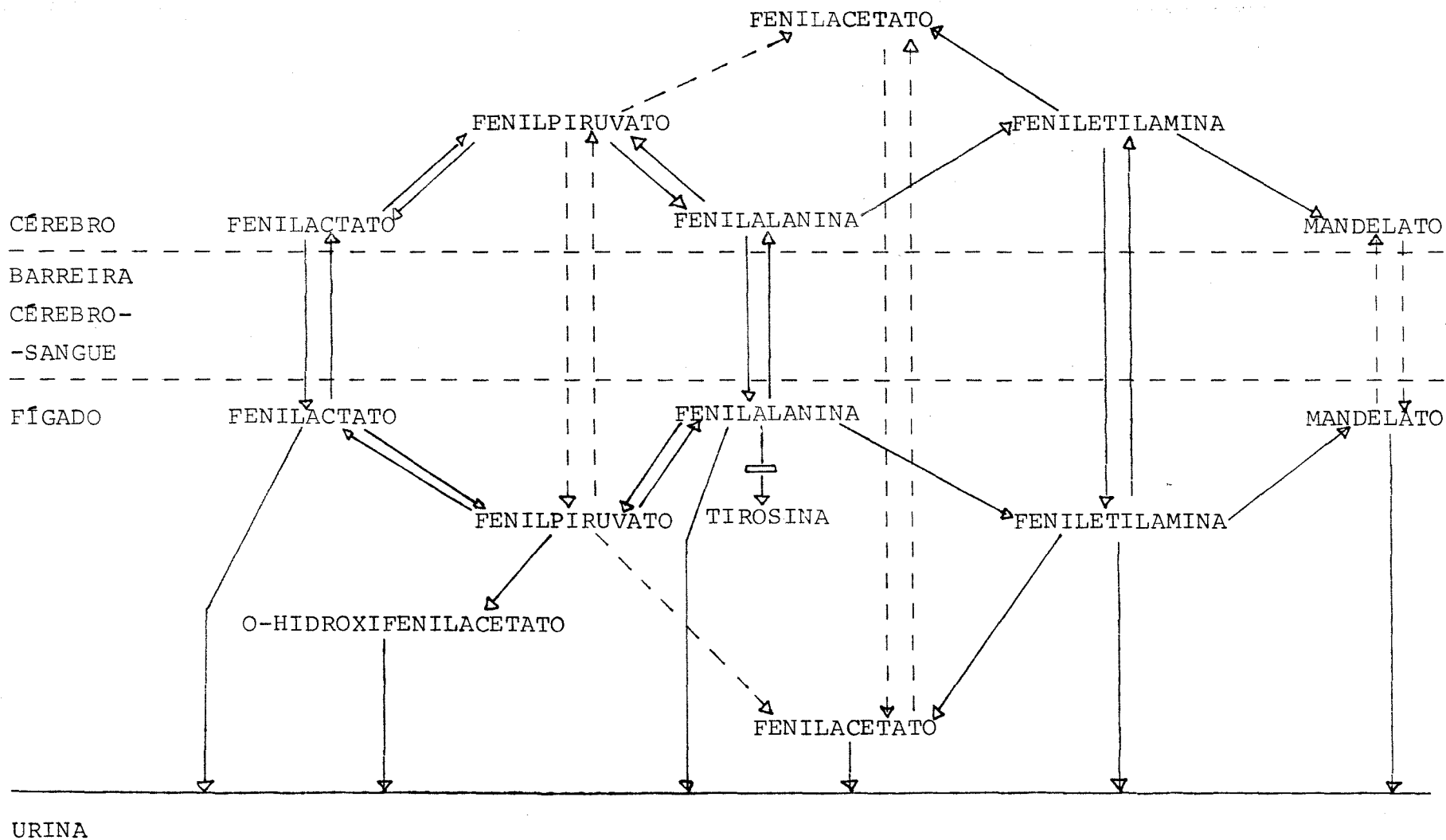


FIGURA 3. Vias do metabolismo da fenilalanina no fígado e cérebro e excreção urinária de metabólitos em condições hiperfenilalaninêmicas.

As linhas sólidas representam vias já demonstradas e as linhas pontilhadas vias que devem ocorrer, mas não foram ainda descritas (EDWARDS & BLAU, 1972).

1.2. Aspectos Estruturais da Fenilalanina Hidroxilase Hepática

A fenilalanina hidroxilase tem sido purificada de fígado de rato (KAUFMAN & FISHER, 1970; AYLING et alii, 1974; SHIMAN et alii, 1979 - citado por TOURIAN & SIDBURY, 1983), seres humanos (AYLING et alii, 1974; FRIEDMAN & KAUFMAN, 1973; WOO et alii, 1974; CHOO et alii, 1979) e macacos (COTTON, 1971 - citado por TOURIAN & SIDBURY, 1983). Kaufman e Fisher obtiveram a enzima de fígado de rato essencialmente purificada em 1970 (KAUFMAN & FISHER, 1970).

A fenilalanina hidroxilase de fígado humano é uma metaloproteína oligomérica contendo subunidades pesadas H (50.000 d) e leves L (49.000 d). Sua forma quaternária tem massa molecular aproximadamente 275.000 d. CHOO et alii (1979) propõem que a subunidade L represente um produto de degradação da subunidade H.

A enzima em fígado de ratos Wistar apresenta apenas uma banda em eletroforese com SDS (NAGATA & HITOSHI, 1984; MERCER et alii, 1984), com massa molecular aproximada de 51.000 d (MERCER et alii, 1984). NAGATA & HITOSHI (1984) determinaram 2 formas distintas ativas através de cromatografia em coluna de cálcio - fosfato, de cinética e composição de aminoácidos semelhantes, podendo ser codificadas pelo mesmo gene. A forma chamada F_1 era predominante e de massa molecular 24.000 d, sugerindo que a enzima seja composta por 4 subunidades idênticas. As formas encontradas no rim são similares às observadas no fígado, apenas em concentração 10 vezes menor, indicando que o mesmo gene da fenilalanina hidroxilase seja expresso nestes dois tecidos.

dos (MERCER et alii, 1984).

Extratos de fígado de feto humano de 11 a 20 semanas a presentam fenilalanina hidroxilase, tetraidrobiopterina e diidrofolato redutase (RÄIHÄ, 1973). JAKUBOVIC (1971) encontrou atividade da fenilalanina hidroxilase em fígado de fetos de 13 semanas, similar à encontrada em adultos. Por outro lado, resultados por ele descritos sugerem que o sistema de hidroxilação seja deficiente nas crianças prematuras mesmo na presença de fe nilalanina hidroxilase. A ontogenia da fenilalanina hidroxilase hepática difere da renal em seres humanos (WOO et alii, 1974).

Autores relataram que em fígado de rato com menos de 24 horas de idade a atividade do sistema de hidroxilação é negligenciável e que a atividade aproxima-se dos níveis adultos vários dias após o nascimento. Os autores concluíram que o com ponente desaparecido no fígado de animais recém-nascidos é a en zima fenilalanina hidroxilase (KENNEY et alii, 1958). Entretanto, BRENNEMAN & KAUFMAN (1965), encontraram um sistema de hidro xilação da fenilalanina em fígado de ratos recém-nascidos apenas levemente menor do que em adultos, sendo esta menor ativida de não devida a ausência de fenilalanina hidroxilase, mas sim, à diminuição dos níveis do cofator e provavelmente de diidropterina redutase.

FREEDLAND et alii (1962) demonstraram que em ratos al binos a atividade da fenilalanina hidroxilase aumenta igualmente, em ambos os sexos, com a idade, apresentando um pico entre 35 e 40 dias, com maior incremento entre 18 e 21 dias. A partir do 40º dia, declina até estabilizar, por volta de 50 dias de idade. Nos ratos adultos, as fêmeas mostram níveis de atividade

mais baixos que os machos.

A molécula de fenilalanina hidroxilase de rato parece conter 2 átomos de ferro e uma flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (WOO et alii, 1974), similar à enzima humana.

A fenilalanina hidroxilase é uma enzima alostérica sendo ativada e regulada pela fenilalanina, a qual se liga a um sítio distinto do sítio catalítico (TOURIAN, 1971); (SHIMAN & GRAW, 1979 - citado por TOURIAN & SIDBURY, 1983).

2. Hiperfenilalaninemias Humanas

2.1. Classificação das Hiperfenilalaninemias

As hiperfenilalaninemias (HFA) compreendem um grupo de distúrbios metabólicos causados por um defeito genético no sistema enzimático que cataliza a conversão de fenilalanina a tirosina, causando elevados níveis circulantes e teciduais de fenilalanina (TOURIAN & SIDBURY, 1983).

As hiperfenilalaninemias hoje estão classificadas em 8 tipos diferentes, de acordo com o defeito metabólico primário (Tabela 1). O tipo I, com ausência de atividade da fenilalanina hidroxilase, corresponde à fenilcetonúria clássica (PKU). Os tipos II, III, IV e V correspondem a variantes de fenilcetonúria. A elucidação do sistema complexo de hidroxilação de fenilalanina permitiu a identificação dos defeitos metabólicos nas variantes (Figura 4).

Todas as hiperfenilalaninemias parecem ser autossômicas recessivas, com exceção da HFA tipo VI, que foi observada

TABELA 1. Classificação das hiperfenilalaninemias.

Tipo	Nome	Aspectos clínicos	Defeito	Fenilalanina	Tirosina
I	Fenilcetonúria Clássica.	Retardo mental e sintomas associados, se não tratados.	Fenilalanina-4-hidroxilase ausente.	Maior que 20 mg/100 ml com dieta normal.	Normal - baixa
II	Hiperfenilalaninemia	Normal: pode apresentar retardo, nos casos mais severos se não há tratamento.	Decréscimo na atividade da fenilalanina-4-hidroxilase.	Precocemente é igual ao tipo I, depois os níveis se mantêm entre 4-20 mg/100 ml.	Normal - baixa
III	Hiperfenilalaninemia.	Normal	Atraso na maturação da hidroxilase da fenilalanina.	Precocemente é igual ao tipo I, voltando a níveis normais progressivamente.	Normal - baixa
IV	Deficiência na di-hidrobiopterina redutase	Inicialmente normal, convulsões, desenvolvimento anormal no primeiro ano de vida.	Deficiência ou ausência da di-hidrobiopterina redutase.	Variável, pode ser como no tipo I.	Normal.
V	Função anormal da di-hidrobiopterina	Mioclonia, movimentos incontrolados, tetraplegia, pele gordurosa, hipertermia recorrente.	Defeito na síntese da di-hidrobiopterina.	Pode ser maior que 200 mg/100 ml.	Normal
VI	Hiperfenilalaninemia persistente e tirosinemia.	Ataxia progressiva e convulsões aparecendo entre os 12 e 18 meses de idade.	Catabolismo da tirosina.	10 mg/100 ml.	Elevada

TABELA 1. Continuação.

Tipo	Nome	Aspectos clínicos	Defeito	Fenilalanina	Tirosina
VII	Tirosinemia neonatal transitória.	Associada com baixo peso ao nascer e alta ingestão de proteínas.	Inibição da oxidação do ácido p-hidroxifenilpirúvico.	Transitoriamente elevada, oscila de 4 a 20 mg/100 ml.	Transitoriamente elevada: oscila de 5 a 50mg/100 ml.
VIII	Tirosinemia hereditária.	Doença renal crônica.	Deficiência de: 1) desidrogenase do p-OH-fenilpiruvato; 2) tirosina aminotransferase citoplasmática e 3) fumarilacetato.	2 a 8 mg/100 ml.	4 mg/100 ml.

Fonte: TOURIAN & SIDBURY (1983).

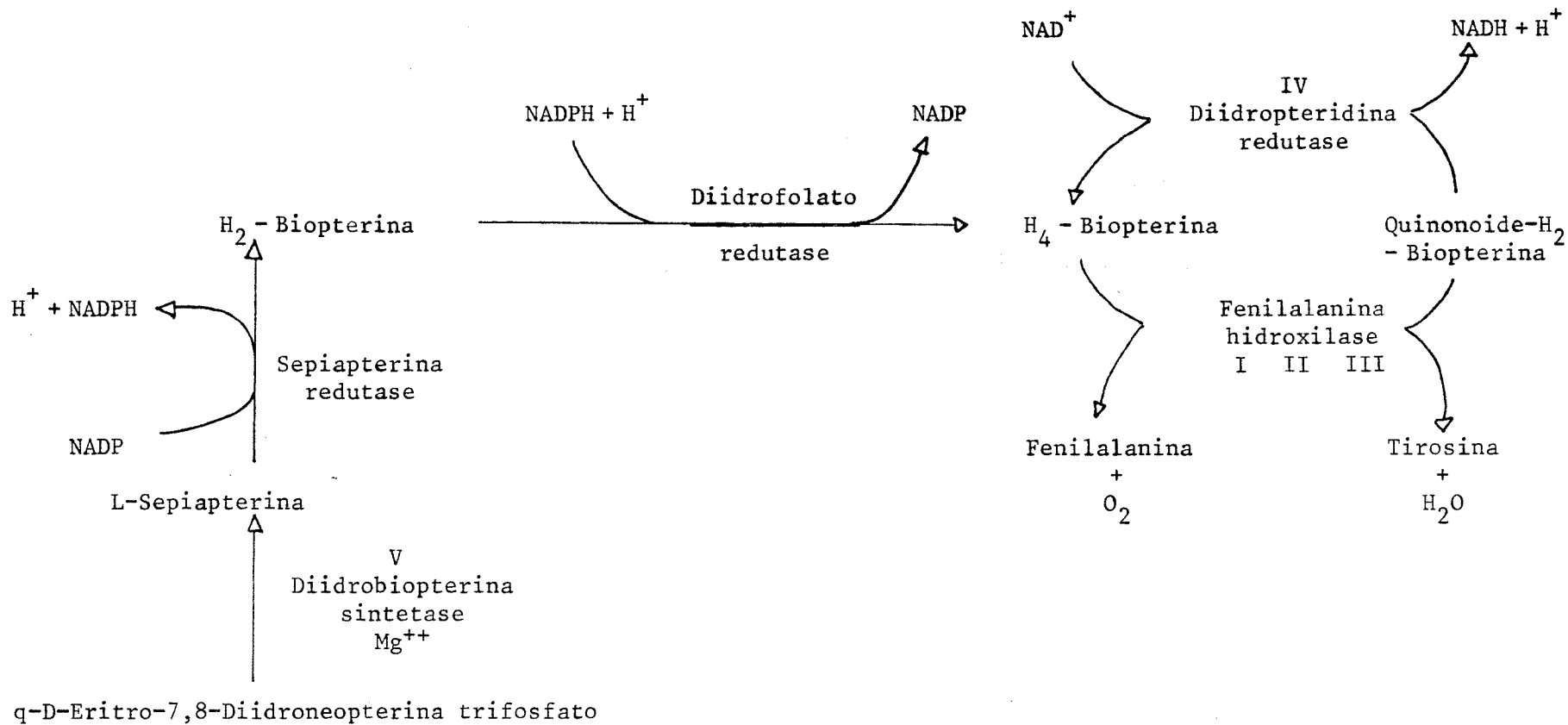


FIGURA 4. Esquema da hidroxilação da fenilalanina e transformação do cofator. Os números romanos indicam os sítios de bloqueio enzimático na hiperfenilalaninemia designada. (TOURIAN & SIDBURY, 1983).

apenas em homens, parecendo possuir herança recessiva ligada ao cromossoma X (TOURIAN & SIDBURY, 1983).

A incidência de fenótipo fenilcetonúria clássica entre brancos é cerca de 1:11.000, enquanto que para as hiperfenilalaninemias não do tipo I, é aproximadamente 1:43.000 (SCRIVER & CLOW, 1980b).

3. Fenilcetonúria

3.1. Histórico

A primeira descrição de fenilcetonúria (PKU) foi realizada por Fölling em 1934, tendo demonstrado acúmulo de ácido fenilpirúvico na urina de certos pacientes com retardo mental. Fölling chamou de "Imbecillitas phenilpirouvica" aquela doença aparentemente devida a um defeito genético no metabolismo da fenilalanina e associada a retardo mental (JERVIS, 1934 - citado por GÜTTLER, 1980, 1984). Penrose reforçou a suspeita de doença hereditária sugerindo que a transmissão fosse autossômica-recessiva (PENROSE, 1935 - citado por GÜTTLER, 1980). Penrose e Quastel, em 1937 denominaram-na de fenilcetonúria (PKU) por ser encontrado excesso de ácido fenilpirúvico na urina dos pacientes.

Bernheim e Bernheim demonstraram que a principal via catabólica da fenilalanina é a para-hidroxilação convertendo-a em tirosina (GÜTTLER, 1984).

JERVIS, em 1947, identificou o erro metabólico da fenilcetonúria (PKU). Mostrou que pacientes fenilcetonúricos não eram capazes de aumentar a concentração sérica de tirosina após

administração de fenilalanina, como ocorria em pessoas normais.

UDENFRIEND & COOPER (1952) descreveram o sistema enzimático da conversão da fenilalanina em tirosina e um ano depois Jervis mostrou que extratos de fígado removido "post mortem" de pessoas normais, mas não de fenilcetonúricos, conseguiam realizar esta conversão (JERVIS, 1953).

BICKEL et alii (1954) reportaram que a dieta pobre em fenilalanina em uma criança de 2 anos, provocou redução da concentração sérica de fenilalanina, desaparecimento de fenilpiruvato na urina, melhoria no desenvolvimento físico e amenização de sintomas neurológicos. Os efeitos sobre o retardo mental foram pouco marcantes.

Os resultados obtidos com o tratamento dietético incentivaram a investigação em massa de recém-nascidos e o primeiro programa de "screening" foi feito na Califórnia por Centerwall em 1957 e na Grã-Bretanha por Gibbs & Woolf em 1959 e por Boyd em 1961 (GÜTTLER, 1980).

Em 1963, os autores GUTHRIE & SUSI introduziram um método de investigação em massa, simples e sensível, semiquantitativo para a determinação da fenilalanina sangüínea, em pequenas amostras. A partir daquela data, a detecção de hiperfenilalaninemia em recém-nascidos passou a ser progressivamente realizada em vários países.

3.2. Aspectos Clínicos

Há um grupo de sinais clínicos que se manifestam em maior ou menor intensidade após o primeiro ano de vida: hipo-

pigmentação da pele, eczema, atraso do desenvolvimento psicomotor, dificuldade para falar e andar, convulsões, hiperatividade, comportamento agressivo, hipertonicidade muscular, tremores, microcefalia, maxilar proeminente com espaços interdentários alargados, hipoplasia dentária, descalcificação dos ossos longos, retardo do crescimento, anormalidades no eletroencefalograma (EEG) (NYHAN, 1979); (FOIS et alii, 1955; POLEY Jr. & DUMERMUTH, 1968 - citados por TOURIAN & SIDBURY, 1983). Pacientes fenilcetonúricos não tratados nos primeiros 6 meses de vida apresentam, geralmente, um QI menor que 50 (TOURIAN & SIDBURY, 1983).

Crianças com níveis elevados de fenilalanina plasmática, geralmente acima de $20 \text{ mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$ ou $1.200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ e intolerância à sobrecarga de fenilalanina são classificadas como fenilcetonúricas. A detecção de heterozigose nos pais pode ser um dado diagnóstico auxiliar (GÜTTLER, 1984).

Há grande interesse na detecção de heterozigotos para fenilcetonúria e os métodos, basicamente, são medidas das concentrações de fenilalanina e tirosina plasmáticas após administração oral ou intravenosa de fenilalanina. Entretanto, estes métodos não permitem certeza na classificação por ocorrer sobreposição de valores com homozigotos normais (GÜTTLER, 1984).

A reação do cloreto férrico na urina para detecção de ácido fenilpirúvico é um teste largamente difundido e útil, quando usado em crianças com mais de 15 dias de vida para levantar a suspeita de fenilcetonúria de outra hiperfenilalaninemia (KNOX, 1972). É importante fazer o diagnóstico diferencial entre pacientes com fenilcetonúria clássica daqueles com hiperfenilala-

fenilalaninemia benigna (que aparentemente não requerem tratamento) e identificar os pacientes com variantes por alteração do cofator da fenilalanina hidroxilase (SCRIVER & CLOW, 1980b).

O paciente fenilcetonúrico tem catabolismo da fenilalanina alterado através do completo bloqueio da reação de hidroxilação deste aminoácido. O controle da concentração de fenilalanina no sangue tem se mostrado eficaz na prevenção das alterações progressivas e irreversíveis do desenvolvimento cerebral (DOBSON et alii, 1977).

Crianças tratadas no primeiro mês de vida com dieta pobre em fenilalanina e suplementada com tirosina, principalmente se for nas primeiras duas semanas de vida, mostram desenvolvimento praticamente normal (GÜTTLER, 1984). Portanto, não há dúvidas de que o tratamento na doença de Fölling, quanto mais precocemente começado, mais efetivo se torna na prevenção do retardo mental.

Deve-se ter cuidado com a aplicação do tratamento, uma vez que a fenilalanina requerida para a síntese protéica varia com a idade. A manutenção de fenilalanina abaixo dos níveis normais tem sido associada com deficiência de crescimento, retardo na maturação óssea, hepatomegalia, repetidas infecções, hipoglicemia e sintomas neurológicos (DODGE et alii, 1975 - citado por TOURIAN & SIDBURY, 1983). Autores discordam a respeito da idade em que se deve parar o tratamento, mas há uma tendência em decrescer o controle aos 8 ou 10 anos, voltando ao tratamento se houver sinais de perda nas funções mentais ou psicomotoras (WILLIANS et alii, 1979; SMITH et alii, 1978).

Outros tratamentos têm sido propostos, como o uso de

fenilalanina amoníase, enzima metabolizadora de fenilalanina, disponível em fontes microbianas, mas altamente antigênica e rapidamente retirada de circulação (SHEN et alii, 1977). AMBRUS et alii (1978) propõem o uso de reatores enzimáticos multi-tubulares para a remoção de fenilalanina sangüínea.

O tratamento de fenilcetonúria com suplementação de fenilalanina hidroxilase não parece prático, uma vez que há dificuldades no isolamento e purificação da enzima em grandes quantidades de tecidos de mamíferos e curta meia-vida na circulação (AMBRUS et alii, 1978).

3.3. Alterações Estruturais e Bioquímicas

Fenilcetonúria clássica é caracterizada por alguns sintomas reversíveis pelo decréscimo de fenilalanina no sangue, como irritabilidade e anormalidades no eletroencefalograma (EEG) e por sinais irreversíveis, como o retardo mental.

O mecanismo para a produção dos efeitos irreversíveis permanecem incertos. Várias alterações metabólicas que ocorrem em pacientes fenilcetonúricos têm sido relacionadas como possível agente causador de prejuízo no desenvolvimento do cérebro.

Exames patológicos em cérebro de pacientes fenilcetonúricos revelaram redução no peso do cérebro (ALVORD et alii, 1950), comprometimento do desenvolvimento morfológico (BAUMAN & KEMPER, 1974 - citado por CORDERO et alii, 1983; MENKES, 1967), retração nas ramificações dendríticas das células piramidais e redução do número de espinhas dendríticas no córtex (BAUMAN & KEMPER, 1982). Há menor quantidade de lipídios associados à mielina, par

ticularmente os galactolipídios (AGRAWAL & DAVISON, 1973 - citado por TOURIAN & SIDBURY, 1983). Também os proteolipídios e sulfatídios são encontrados em menores concentrações (TOURIAN & SIDBURY, 1983).

A alteração bioquímica mais constante corresponde à elevação de fenilalanina no sangue (JERVIS et alii, 1940); (BOREK et alii, 1950 - citado por BICKIS et alii, 1957); STEIN et alii, 1954 - citado por BICKIS, 1957); TOURIAN & SIDBURY, 1983) e no fluido céfalo-raquidiano (CSF) (BOREK et alii, 1950 - citado por BICKIS et alii, 1957) com quantidades normais ou decrescidas de tirosina (PARTINGTON & LEWIS, 1963; TOURIAN & SIDBURY, 1983), como consequência imediata da incapacidade destes pacientes em converter fenilalanina em tirosina.

Foi demonstrado defeito na biossíntese de catecolaminas em pacientes fenilcetonúricos (NADLER & HSIA, 1961; Mc KEAN, 1972) parecendo haver uma relação inversa entre concentração plasmática de fenilalanina a excreção urinária de dopamina (KRAUSE et alii, 1985).

Os níveis plasmáticos de triptofânio (Mc KEAN, 1972) e de 5-hidroxitriptofânio estão decrescidos (PARE et alii, 1959), e há também diminuição no conteúdo cerebral de serotonina (Mc KEAN, 1972).

As alterações na biossíntese de dopamina, noradrenalina e 5-hidroxitriptamina encontradas em pacientes fenilcetonúricos não tratados são corrigidas pela administração de dieta com baixas concentrações de fenilalanina e suplementação de tirosina.

Em fenilcetonúria clássica tem sido documentada a defi

ciência de mielina no Sistema Nervoso Central, parecendo que o comprometimento da síntese protéica cerebral (APPEL, 1966; SIEGEL et alii, 1971; COPENHAVER, 1973) e do metabolismo dos lipídeos estão envolvidos nesta alteração da doença.

Altos níveis séricos de fenilalanina reduzem o suprimento cerebral de outros aminoácidos e isto é confirmado por experimentação em animais (PRATT, 1982). O desequilíbrio de aminoácidos no cérebro é um dos mecanismos propostos pelos quais o excesso de fenilalanina altera a biossíntese cerebral de aminas biogênicas, o crescimento e o desenvolvimento do cérebro em fenilcetonúricos (Mc KEAN & BOGGS, 1966; OLDENDORF, 1973; BANOS et alii, 1974; PARDRIDGE & OLDENDORF, 1975; PRATT, 1982).

A captação de nutrientes pelo cérebro é feita através do transporte pela barreira cérebro-sangue, de estrutura complexa, localizada na superfície das células endoteliais dos capilares cerebrais (BRIGHTMAN & REESE, 1969 - citado por PRATT, 1982), e ainda pelas membranas das células cerebrais.

A barreira cérebro-sangue contém um sistema de transporte para os aminoácidos precursores de neurotransmissores: triptofânio e tirosina. Este sistema transporta outros aminoácidos neutros (LNAA) além do triptofânio e de tirosina: treonina, aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina), fenilalanina e metionina. A cinética de transporte de aminoácidos neutros (LNAA) através da barreira cérebro-sangue é competitiva entre cada aminoácido (OLDENDORF, 1973; WURTMAN et alii, 1980).

A captação tanto de tirosina quanto de triptofânio pelo cérebro através da barreira cérebro-sangue depende, direta-

mente, de sua própria concentração plasmática e, inversamente, da soma das concentrações de seus competidores, os aminoácidos neutros (LNAA) (AGHARANYA et alii, 1981), ou seja, das relações tirosina e triptofânio.

 ΣLNAA

 ΣLNAA

Portanto, o aumento plasmático de fenilalanina pode limitar o transporte de tirosina e triptofânio e diminuir a disponibilidade destes aminoácidos para a síntese de neuropeptídeos ou conversão a aminas biogênicas (NADLER & HSIA, 1961; OLDENDORF, 1973; PARDRIDGE & OLDENDORF, 1975; PARDRIDGE, 1979; WURTMAN et alii, 1980); (PRATT, 1981 - citado por PRATT, 1982). A modalidade de tratamento com redução da relação fenilalanina/tirosina por suplementação de tirosina (BRASS & GREENGARD, 1982) parece ineficaz (BATSHAW et alii, 1981), talvez pelo fato de que isto dificulta ainda mais a captação cerebral de triptofânio e outros aminoácidos neutros (LNAA). O efeito da fenilalanina sobre o metabolismo de aminoácidos no cérebro é complexo, causando distúrbios em mais de um sistema de transporte (PRATT, 1982).

Embora o metabolismo defeituoso de serotonina possa ser causado pela inibição competitiva de fenilalanina pela captação neural de seus precursores triptofânio (YUWILER et alii, 1965), 5-hidroxitriptofânio (SCHAMBERG & GIARMAN, 1960; Mc KEAN et alii, 1962; BUTIER et alii, 1981), a fenilalanina inibe competitivamente a hidroxilação do triptofânio pela triptofânio hidroxilase, enzima limitante de velocidade de síntese de 5-hidroxitriptofânio (FREEDLAND et alii, 1961 - citado por YUWILER et alii, 1965); (GRAHAME-SMITH & MOLONEY, 1965 - citado por KRAUSE et alii, 1985); (WURTMAN et alii, 1980) e também a síntese da en-

zima 5-hidroxitriptofânio descarboxilase (BUTIER et alii, 1981). A biossíntese defeituosa de catecolaminas pode ser parcialmente explicada pela inibição de captação da tirosina e da L-Dopa pela barreira cérebro-sangue em adição à inibição das enzimas tirosina hidroxilase e DOPA descarboxilase causada por altas concentrações de fenilalanina (BUTIER et alii, 1981).

MENKES, em 1967, sugeriu que os efeitos reversíveis da fenilcetonúria pudessem ser causados por ação neurotóxica direta dos metabólitos da fenilalanina.

Embora o ácido o-hidroxifenilacético esteja presente na urina em grande quantidade nos pacientes fenilcetonúricos, (ARMSTRONG et alii, 1955) não parece exercer efeitos tóxicos (SANDLER, 1982).

Sintomas esquizofrênicos manifestados por grande parte de pacientes fenilcetonúricos podem ser causados pelo acúmulo de feniletilamina, que possui propriedades farmacológicas similares às das anfetaminas (MANTEGAZZA & RIVA, 1963 - citado por SANDLER, 1982), parecendo causar profundo decréscimo em gangliosídeos no córtex cerebral de ratos (LOO et alii, 1980). Parece também que este metabólito da fenilalanina está envolvido na alteração do metabolismo da serotonina através da redução da alta afinidade de captação sinaptossomal de transmissores (LOO et alii, 1980). Embora DAVISON & SANDLER (1958) tenham demonstrado inibição da 5-hidroxitriptofânio descarboxilase pelo ácido fenilacético e PARE et alii (1958) tenham reproduzido esta inibição "in vivo", BICKEL et alii (1955) - citado por BICKIS et alii (1957) reportaram que a adição de L-fenilalanina ou de ácido fenilpirúvico à alimentação de crianças fenilcetonúricas pro

duziram deterioração em seu estado mental, o mesmo não ocorrendo quando era adicionado o ácido fenilacético.

LOO et alii (1980) demonstraram que elevados níveis de fenilacetato no cérebro durante o período pós-natal estão associados com as alterações de longo prazo observadas no desenvolvimento cerebral de ratos.

Em fenilcetonúria, ocorre uma reação de condensação entre dopamina e ácido fenilpirúvico (LASALA & CONSCIA, 1979 - citado por SANDLER, 1982), resultando em um composto inibidor da dopamina β -hidroxilase, possivelmente levando a um decréscimo na produção de noradrenalina.

FELLMAN (1956), verificou que ácidos fenólicos em concentrações similares às encontradas em fenilcetonúria inibem as enzimas 5-hidroxitriptamina descarboxilase e DOPA descarboxilase.

Metabólitos de ácidos aromáticos inibem a descarboxilase do ácido glutâmico (HANSON, 1958 - citado por SANDLER, 1982), causando decréscimo nos níveis de ácido γ -aminobutírico (GABA).

O fenilpiruvato inibe, "in vitro", a hexoquinase cerebral (WEBER, 1969), e a síntese do colesterol a partir do ácido mevalônico (SHAH et alii, 1969), sendo, portanto, tóxico para a formação de mielina (SILBERBERG, 1967).

3.4. Modelos Animais de Fenilcetonúria

A lesão primária no fígado, as alterações bioquímicas no sangue e os distúrbios na função cerebral estão bem estabelecidas na fenilcetonúria, mas há dificuldades em se determinar a

hierarquia das causas, distinguir entre causa e efeito e em relacionar estruturas e função.

Uma dieta com pouca fenilalanina evita deterioração mental quando iniciada logo após o nascimento, indicando que não é o defeito genético, mas a hiperfenilalaninemia presente durante a infância que causa dano cerebral.

O modelo animal permite acesso de relativo valor ao estudo de mecanismos pelos quais uma anormalidade metabólica específica resulta em prejuízo do cérebro e alterações comportamentais, ajudando na compreensão de pelo menos alguns aspectos da doença humana.

Várias abordagens à fenilcetonúria têm sido feitas e os modelos animais foram introduzidos por AUERBACH et alii (AUERBACH et alii, 1958).

Os modelos animais para estudo da fenilcetonúria estão essencialmente divididos em agudos e crônicos, com ou sem uso de inibidores da fenilalanina hidroxilase hepática. Existem numerosos trabalhos que utilizam a mais variada metodologia para indução de hiperfenilalaninemia. Há grande variabilidade na idade do animal, no tempo de duração do tratamento - mesmo entre os modelos crônicos -, no uso de diferentes inibidores da atividade da fenilalanina hidroxilase hepática, como por exemplo, p-clorofenilalanina ou α -metilfenilalanina, e nas diversas concentrações de fenilalanina suplementando dieta normal.

Os modelos animais que utilizam p-clorofenilalanina parecem insatisfatórios, com a droga apresentando numerosos efeitos colaterais incluindo alta mortalidade (LANE et alii, 1980) e inibição da triptofânio hidroxilase hepática (KOE & WEISSMAN,

1966), o que não foi observado com o uso de α -metilfenilalanina (GREENGARD et alii, 1976).

Ao se avaliar aprendizado de animais hiperfenilalaninêmicos, devem ser levados em consideração todos os aspectos mencionados acima, além do próprio método de análise comportamental. O retardo mental resultante da desordem metabólica é a expressão de uma alteração global no cérebro, todos os aspectos comportamentais estando alterados em algum grau. Portanto, um único teste de aprendizado comprometido ou numa mesma linha de visão é insuficiente para validar a existência de fenilcetonúria experimental (ANDERSEN & GUROFF, 1972). MUNN (1950) - citado por SCHLOCK & KLOPFER (1967), sugere que testes de discriminação simples não são eficazes em separar ratos fenilcetonúricos de normais.

Alguns autores têm chamado atenção ao fato da tarefa comportamental ser realizada durante ou imediatamente após o tratamento crônico com fenilalanina (POLIDORA et alii, 1966; SCHALOCK & KLOPFER, 1967; ANDERSEN & GUROFF, 1972; STRUPP et alii, 1984). Argumentam que o mau desempenho destes animais pode ser devido a efeitos tóxicos específicos daquele aminoácido (PERRY et alii, 1965; POLIDORA, 1967) já que a deficiência de aprendizado evidenciada durante o período de síndrome é frequentemente revertida quando o tratamento é interrompido (POLIDORA et alii, 1966). Sugerem ser necessário um período de recuperação entre o tratamento e a avaliação comportamental para avaliar alterações irreversíveis.

STRUPP et alii (1984) sugerem o uso de tarefas de aprendizado vantajoso, mas não essencial, onde a informação a ser

aprendida não seria crítica para as necessidades orgânicas, e por isso mais sensíveis a danos biológicos que muitas vezes são indiferenciáveis de variações emocionais e de motivação por tarefas comumente usadas, de aprendizado essencial para obtenção de alimentos ou esquivas de eventos aversivos. Os autores encontram deficiências permanentes nas tarefas não essenciais.

Alguns modelos têm reproduzido muitas das mudanças que ocorrem no cérebro de pessoas fenilcetonúricas, incluindo elevadas concentrações de fenilalanina (Mc KEAN, 1972; AOKI & SIEGEL, 1970; GREENGARD et alii, 1976; DEL VALLE et alii, 1978; KOHSAKA & TSUKADA, 1979; HUETER et alii, 1984), decréscimo de aminoácidos de cadeia ramificada (LOWDEN & LA RAMEE, 1969; ISAACS & GREENGARD, 1980; LANE et alii, 1980) e depressão de serotonina (Mc KEAN et alii, 1962; HSIA et alii, 1963; BOGGS & WAISSMAN, 1964; YUWILER et alii, 1965; KOHSAKA & TSUKADA, 1979; ISAACS & GREENGARD, 1980; LANE et alii, 1980; GIBSON et alii, 1982; HUETER et alii, 1984).

A hiperfenilalaninemia causa depressão nos níveis cerebrais de treonina, valina, metionina, isoleucina, leucina, histidina e triptofânio em ratos imaturos e adultos, sendo os aminoácidos de cadeia ramificada os mais afetados (Mc KEAN et alii, 1968). Além da fenilalanina inibir a captação daqueles aminoácidos pelo cérebro competindo pelo transporte através da barreira cérebro-sangue (GUROFF & UDENFRIEND, 1962; LINDROOS & OJA, 1971; OLDENDORF, 1973), também parece influir no efluxo dos mesmos, a partir das células cerebrais (HUCHES & JOHNSON, 1976).

APPEL (1966) sugeriu que o retardo mental associado à fenilcetonúria resulta do comprometimento da síntese protéica

no cérebro em desenvolvimento. Hiperfenilalaninemia aguda também leva à inibição transitória da síntese protéica cerebral em ratos jovens mas não em ratos adultos (AOKI & SIEGEL, 1970).

Há vários mecanismos propostos na tentativa de explicar as alterações na síntese de proteínas cerebrais.

Em fatias de cérebro de rato foi demonstrado que os aminoácidos neutros são transportados pelos sistemas A (o maior sistema dependente de sódio na maioria das células de mamíferos), ASC (sistema sódio-dependente distinto de A) e/ou sistema L (sódio independente), pelo menos até 23 dias de idade (RIGGS et alii, 1984). Estes sistemas são encontrados em cérebro de ratos recém-nascidos e adultos. O sistema L, o qual provavelmente se desenvolve até o 23º dia de vida (RIGGS et alii, 1984) é o responsável, ao menos, pelo transporte de fenilalanina, tirosina e triptofânio (PARDRIDGE & OLDENDORF, 1975; PRATT, 1979). A elevada concentração de vários aminoácidos encontrada no cérebro imaturo mas não no cérebro maduro (Mc KEAN et alii, 1968; GREENGARD & BRASS, 1984) parece dever-se mais à grande atividade do sistema L do que à difusão passiva através da barreira cérebro-sangue incompleta. Alguns sistemas de transporte que fazem parte da barreira cérebro-sangue em ratos adultos também estão presentes em animais bastante jovens, mas a capacidade de cada sistema muda com a idade (CREMER et alii, 1976).

Cerca de 30 dias após o nascimento, o cérebro de ratos tem capacidade em restringir a entrada de fenilalanina similar à do adulto, sendo a captação deste aminoácido muito maior nas primeiras 3 semanas de vida (GREENGARD & BRASS, 1984). Embora a fenilalanina não seja transportada contra-gradiente, o cérebro

bro adulto tem um sistema de efluxo eficaz para este aminoácido (LAJTHA & TOTH, 1962).

Alguns autores acreditam que hiperfenilalaninemia experimental aguda em animais jovens iniba a síntese protéica cerebral por causar decréscimo na velocidade de iniciação (TAUB & JOHNSON, 1975) e de alongamento da cadeia polipeptídica (HUGHES & JOHNSON, 1978). Mecanismos sugeridos incluem ação de ribonucleases lisossomais sobre polirribossomos impossibilitando a formação do complexo de iniciação (ROBERTS & MORELOS, 1976) ou deficiência do metionil-tRNA iniciador (HUGHES & JOHNSON, 1977 e 1978). Elevadas concentrações de fenilalanina produzem aumento da atividade da ribonuclease e alteração na fosforilação de proteínas ribossomais em ratos jovens. Estes efeitos são revertidos pela administração de aminoácidos neutros (ROBERTS & MORELOS, 1980).

Hiperfenilalaninemia aguda resulta em desagregação de polirribossomos cerebrais apenas em animais jovens (AOKI & SIEGEL, 1970; TAUB & JOHNSON, 1975). Este efeito parece estar relacionado com a perda de triptofânio pelo tecido nervoso, uma vez que este aminoácido parece ser importante na formação de polirribossomos e na manutenção da velocidade normal de síntese protéica (SIDRANSKY et alii, 1967; PRONCZUK et alii, 1968; AOKI & SIEGEL, 1970).

Em ratos adultos a desagregação de polirribossomos não é verificada (AOKI & SIEGEL, 1970; TAUB & JOHNSON, 1975). Isto sugere que a maturação cerebral leva a uma resistência à desagregação induzida por altas concentrações de fenilalanina.

A síntese protéica também não é alterada pela hiperfe-

nilalaninemia aguda em ratos adultos (AOKI & SIEGEL, 1970). BERGER et alii (1978, 79) - citados por BERGER et alii (1980) concluíram que fenilalanina pode profundamente influenciar na síntese protéica cerebral de ratos jovens, enquanto que o efeito do excesso de fenilalanina é bem menos pronunciado em ratos adultos.

HUGHES & JOHNSON (1978) mostraram que tratamento de hiperfenilalaninemia aguda em ratos com mistura de aminoácidos neutros previne a inibição da síntese protéica cerebral, mesmo na presença de concentrações cerebrais de fenilalanina 70 vezes maior que as normais. Isto sugere que o mecanismo fundamental de inibição da síntese protéica é o desequilíbrio de aminoácidos e não a elevação pura e simples dos níveis de fenilalanina.

Hiperfenilalaninemia crônica, induzida por administração diária de α -metilfenilalanina mais fenilalanina, tem o mesmo efeito sobre a síntese protéica cerebral em ratos recém-nascidos que hiperfenilalaninemia aguda: inibe velocidade de iniciação e alongamento da cadeia polipeptídica (BINEK et alii, 1981 - citado por BINEK-SINGER & JOHNSON, 1982). O tratamento de ratos hiperfenilalaninêmicos crônicos com L-isômeros de leucina, isoleucina, valina, treonina, tirosina, triptofânio e metionina previne parcialmente a deficiência cerebral em aminoácidos neutros e bloqueia completamente a inibição da síntese protéica cerebral (BINEK-SINGER & JOHNSON, 1982).

DILLEHAY et alii (1980) trabalhando com linhagem A₉ de células L de camundongos verificaram que a alanina reverte por completo a inibição do crescimento celular e da síntese protéica provocada por excesso de fenilalanina. HUETHER et alii (1985)

demonstraram que a administração adicional de lisina a ratos lactantes hiperfenilalaninêmicos impede a queda de aminoácidos no soro e cérebro, prevenindo o retardo no desenvolvimento cerebral.

O desenvolvimento do cérebro de seres humanos e de animais é marcadamente afetado por excesso crônico de fenilalanina no sangue (WAISSMAN et alii, 1960; SCHLESINGER et alii, 1969). Excesso de fenilalanina tem sido associado com deficiência de mielina, tanto em fenilcetonúricos humanos (SHAH et alii, 1972) quanto em animais com hiperfenilalaninemia induzida experimentalmente (PRENSKY et alii, 1971; SHAH et alii, 1972).

No cérebro humano são detectados 2 períodos de proliferação celular maior (DOBBING & SANDS, 1970; WINICK et alii, 1970): o primeiro começa entre 15 e 20 semanas de gestação e corresponde à proliferação neuroblástica; o segundo período corresponde à multiplicação de células gliais e neurogênese restrita a microneurônios em determinadas áreas cerebrais, começando na 25ª semana de gestação e continuando pelo segundo ano de vida pós-natal.

Do ponto de vista biológico, o cérebro humano é relativamente maduro aos 4 - 6 anos em termos de desenvolvimento de neurônios e glia, formação de sinapses e grau de mielinização (DODGE et alii, 1975 - citado por BERGER et alii, 1980).

A nível bioquímico, o único efeito a longo prazo da fenilcetonúria clássica que tem sido bem documentado, é a deficiência de mielina no Sistema Nervoso Central (ALVORD et alii, 1950; SHAH et alii, 1972).

Ratos jovens são particularmente apropriados para estu

dos de crescimento e desenvolvimento morfológico do cérebro, sendo que aos 25 dias de idade a maturação do cérebro destes animais equivale à de uma criança de oito anos de idade (HOMMES et alii, 1982).

Hiperfenilalaninemia cronicamente induzida em ratos de 25 dias aumenta o "turnover" da mielina e decresce sua velocidade de síntese. O resultado dos dois processos é o decréscimo no conteúdo total de mielina no cérebro. Isto indica que mesmo em estágios de relativa maturidade de desenvolvimento cerebral, a mielina é vulnerável ao aumento nos níveis de fenilalanina (HOMMES et alii, 1982).

A atividade da enzima 2',3'-nucleotídeo cíclico 3-fosfohidrolase (CNPase) parece refletir o grau de mielinização no Sistema Nervoso Central. Em animais hiperfenilalaninêmicos, seus baixos níveis possivelmente indicam que a maturação da oligodendroglia, responsável pela formação da bainha de mielina no Sistema Nervoso Central, esteja perturbada pelo acúmulo de fenilalanina durante o período pós-natal (KOHSAKA & TSUKADA, 1979). O mesmo foi encontrado em embriões de pintos com hiperfenilalaninemia (ALEJANDRE et alii, 1984).

Por outro lado, hiperfenilalaninemia experimental produz deficiência de proteínas básicas da mielina no Sistema Nervoso Central, provavelmente em decorrência da perda da estabilidade e não por redução da síntese protéica (FIGLEWICZ & DRUSE, 1980).

Vários fatores podem contribuir para a deficiência de mielinização observada em hiperfenilalaninemia: comprometimento do transporte de aminoácidos para o cérebro (Mc KEAN et alii,

1968; OLDENDORF, 1973), diminuição da síntese e aumento da degradação da mielina (BERGER et alii, 1980), inibição da formação dos lipídios da mielina (SHAH et alii, 1969) e redução da proliferação de células gliais (JOHNSON & SHAH, 1984). Alternativamente, a deficiente mielinização no Sistema Nervoso Central pode ser, em parte, secundária a modificações axonais (FIGLEWICZ & DRUSE, 1980).

A maior dificuldade dos modelos experimentais de fenilcetonúria que utilizam sobrecarga de fenilalanina é reproduzir o defeito primário na fenilalanina hidroxilase hepática e a relação entre os níveis de fenilalanina e tirosina circulantes encontrados em fenilcetonúria. A aproximação dos modelos às características da doença tem sido há muito tempo procurada, lançando mão de linhagens genéticas de camundongos com atividade da fenilalanina hidroxilase reduzida (BAUMANN et alii, 1982), ou o uso de hamsters, os quais têm muito menor atividade daquela enzima que os ratos (HORWITZ & WAISSMAN, 1966). Também foram testados inibidores da enzima pteridina redutase, tal como esculina (VALDIVIESO et alii, 1975) e antibióticos como cotrimozole (DHONDT et alii, 1977 - citado por LANE et alii, 1980), mas são frequentemente tóxicos e inespecíficos em sua ação.

LIPTON et alii (1967) induziram hiperfenilalaninemia em ratos com administração de fenilalanina mais p-clorofenilalanina, um inibidor da fenilalanina hidroxilase. Embora algumas características da doença possam ser reproduzidas, p-clorofenilalanina tem vários efeitos tóxicos, como desenvolvimento de cataratas (KOHSAKA & TSUKUDA, 1979; LANE et alii, 1980) e alta mortalidade (LANE et alii, 1980), além de efeitos colaterais como

inibição da triptofânio hidroxilase hepática (KOE & WEISSMAN, 1966). Outro agente químico inibidor da fenilalanina hidroxilase é o análogo da fenilalanina, α -metilfenilalanina, de toxicidade mais baixa que a de p-clorofenilalanina. Nenhum dos dois agentes inibe completamente a atividade da enzima. A α -metilfenilalanina atinge 75% de inibição da fenilalanina hidroxilase hepática, mas não afeta a atividade da enzima renal (DEL VALLE et alii, 1978).

Ratos que receberam tratamento prolongado com α -metilfenilalanina mais fenilalanina não alteraram os níveis das enzimas hepáticas: tirosina aminotransferase, aspartato aminotransferase solúvel e mitocondrial, β -hidroxibutirato desidrogenase e malato desidrogenase NADP dependente, nem das enzimas cerebrais: glutamato desidrogenase, glutamato descarboxilase, β -hidroxibutirato desidrogenase, succinato desidrogenase e aspartato aminotransferase solúvel e mitocondrial (GREENGARD et alii, 1976), mas aumenta a atividade da enzima fenilalanina - piruvato aminotransferase. Também a atividade das enzimas cerebrais hexoquinase, piruvato quinase e lactato desidrogenase não foram diferentes do controle (DEL VALLE et alii, 1978).

Hiperfenilalaninemia induzida cronicamente por α -metilfenilalanina mais fenilalanina mostrou aumentar a atividade da enzima fosfoserina fosfatase cerebral, sem alterar sua atividade no fígado (DEL VALLE et alii, 1978), mas este efeito parece ser secundário à hiperfenilalaninemia e não à α -metilfenilalanina.

A supressão da atividade da fenilalanina hidroxilase hepática "in vivo" com injeção de α -metilfenilalanina (com ou

sem fenilalanina) é um processo lento e irreversível. A atividade mínima é atingida em 20 horas e somente após um período de 48 horas, requerido para a ressíntese da enzima, a atividade retorna ao normal (DEL VALLE et alii, 1978). A inibição da tirosina hidroxilase pela α -metilfenilalanina é rápida e reversível, sendo que a depressão de catecolaminas, que ocorre em ratos jovens, é restaurada dentro de poucas horas (BRASS & GREENGARD, 1982). Ratos com 16 dias de idade não mostram deficiência de dopamina, talvez devido ao amadurecimento da fenilalanina hidroxilase hepática, que não sendo completamente inibida, produz quantidades suficientes de tirosina evitando a depressão do neurotransmissor. Administração aguda de α -metilfenilalanina não altera o conteúdo de serotonina cerebral, pelo menos em ratos com 6 dias de idade (GREENGARD et alii, 1976), e deprime catecolaminas periféricas simpáticas (TORCHIANA et alii, 1970). Tratamento crônico com α -metilfenilalanina mais fenilalanina não altera os níveis cerebrais de noradrenalina e dopamina, mas reduz os níveis de serotonina, possivelmente pelo decréscimo de triptofânio cerebral (LANE et alii, 1980).

4. Aprendizado e Memória

Os processos de aprendizado e memória não são diretamente medidos, mas podem ser inferidos a partir de modificações de comportamento observadas sob condições definidas (DAVIS & SQUIRE, 1984).

A aquisição de mudanças de comportamento causadas por uma experiência denomina-se aprendizado.

Após a aquisição iniciam-se os processos de consolidação - período em que a memória é instável e susceptível a influências endógenas e exógenas - que pode durar minutos ou horas e que pode resultar em memória estável. Esta é capaz de durar até toda vida do animal (SOUZA, 1980).

Existem várias formas de aprendizado experimental (HARLOW et alii, 1971 - citado por SOUZA, 1980). Uma maneira simples de classificá-los é entre aprendizados aversivos e não aversivos. Os primeiros utilizam estímulos dolorosos ao animal, como ocorre nas esquivas ativa e inibitória, enquanto os não aversivos consistem em estímulos não dolorosos, como ocorre na habituação.

Pelo menos os aprendizados estressantes são acompanhados por alterações neuro-humorais e hormonais durante ou após o treino ou teste (GOLD & Mc GAUGH, 1975; IZQUIERDO et alii, 1980; IZQUIERDO et alii, 1980; GOLD & DELANOY, 1981; GOLD & ZORNETZER, 1983; Mc GAUGH, 1983 - citados por NETTO, 1984). Muitas destas alterações são inespecíficas ao aprendizado, mas refletem o grau de estresse associado à experiência (IZQUIERDO et alii, 1980; IZQUIERDO et alii, 1980; GALLAGHER et alii, 1983; Mc GAUGH, 1983 - citados por NETTO, 1984).

Tratamentos farmacológicos podem afetar alguns componentes do processo de aprendizado. Quando aplicados antes do treino podem afetar tanto a aquisição quanto a consolidação ou a evocação; quando aplicado após o treino, em princípio, podem afetar a consolidação ou a evocação. Tratamentos aplicados antes do teste podem afetar a evocação ou variáveis que possam sobre ela influir no momento do teste, como por exemplo, novas

aquisições.

Foram determinadas algumas alterações metabólicas relacionadas com o aprendizado em esquiva ativa de 2 vias: decréscimo de cAMP (adenosina-3',5' monofosfato cíclico), após 25 minutos de treino, em amígdala e hipotálamo e aumento nos níveis de fosforilação de proteínas nucleares em hipocampo e caudato-putamen após 5 minutos de treino que desaparece se ele continua até 25 minutos. O aumento de incorporação de leucina em proteínas de hipocampo e caudato-putamen (4 horas após o treino) e do fígado (2 horas após o treino) se relacionam com a situação de aprendizado (SOUZA, 1980).

Há trabalhos que mostram que a inibição protéica cerebral durante o treino ou logo após seu final inibe o estabelecimento da memória estável. Entretanto, o aumento de incorporação de aminoácidos em proteínas cerebrais em testes que, em princípio, não causam aprendizado (SOUZA, 1980), sugerem que, ou todos os testes oportunizam alguma forma de aprendizado (não medido), ou este aumento é essencial mas não suficiente para o estabelecimento da fase estável da memória

5. Objetivos

1 - Verificar se hiperfenilalaninemia aguda causa comprometimento no desempenho de ratos com 29 - 31 dias de idade, com maturação cerebral similar à de adultos, nos testes comportamentais de esquiva ativa de 2 vias, esquiva inibitória e campo aberto.

2 - Verificar o envolvimento das alterações nos níveis

cerebrais de tirosina e de triptofânio no desempenho dos animais hiperfenilalaninêmicos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais Experimentais

As experiências foram realizadas em ratos Wistar de am bos os sexos com 29 - 31 dias de idade pesando entre 45 g e 94 g ($69,4 \pm 12,34$), provenientes do Biotério do Instituto de Biociênci cias da UFRGS, criados em número de 8 por gaiola e desmamados aos 21 dias de idade. Após o desmame, foram alimentados com raç ão Germani "ad libitum" da mesma forma que os ratos adultos e mantidos durante todo o tempo em ambiente climatizado com cicl os de 12 horas de luminosidade claro-escuro.

Todos os experimentos comportamentais foram realizados entre 10 e 17 horas.

2. Administração do Aminoácido

L-Fenilalanina (Merck) foi dissolvida em solução salina (NaCl 0,85 g% - Merck) por aquecimento a 80°C , na concentração de 4 g% e injetada intraperitonealmente em um volume correspondente a $2,5 \text{ ml} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal. A dose administrada de fenilalanina correspondia a $100 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal. Os animais controles receberam volumes equivalentes de so

lução salina.

3. Tratamentos com Drogas

3.1. Administração de α -metil-D,L-fenilalanina

α -Metil-D,L-fenilalanina (Sigma) foi dissolvida em solução salina na concentração de 1,43 g%, sendo o pH final ajustado a 7,2 com NaOH 1,0 N e injetada no tecido subcutâneo do dorso do rato num volume correspondente a $3,0 \text{ ml} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal. A dose de α -metil-D,L-fenilalanina administrada correspondia a $43 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal (BRASS & GREENGARD, 1982). O grupo controle recebeu igual volume de solução salina.

Após 20 horas, os animais que receberam previamente α -metilfenilalanina foram injetados intraperitonealmente com solução salina ou solução de L-fenilalanina 3,6 g% na dose de $90 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal em volume de $2,5 \text{ ml} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal.

O grupo controle recebeu solução salina via intraperitoneal em volume equivalente.

3.2. Administração de β -bloqueador adrenérgico (Propranolol)

Propranolol foi dissolvido em solução salina na concentração de $0,2 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal (IZQUIERDO & DIAS, 1983) e injetado intraperitonealmente associado à L-fenilalanina 4 g% ou solução salina, nos animais dos grupos experimental

e controle da droga, respectivamente.

O grupo controle recebeu volumes equivalentes de solução salina intraperitonealmente.

Todas as soluções injetadas foram previamente aquecidas a 37°C.

4. Coleta da Amostra

Para as determinações bioquímicas, os animais foram sacrificados por decapitação. O sangue foi coletado sem adição de anticoagulante. Após a retração do coágulo, o soro foi centrifugado a 1.000 g por 10 minutos em centrífuga Janetski T32A.

Foi adicionado ao soro igual volume de uma solução de TCA 0,6 N (Sigma); a mistura foi centrifugada a 1.600 g por 10 minutos em centrífuga Janetzki T 32 A e o sobrenadante desproteínezado foi recolhido.

O cérebro era rapidamente retirado, colocado sobre placa de Petri invertida e em contacto com o gelo - para manter a temperatura em torno de 4°C. Bulbo olfatório, tronco encefálico e cerebelo foram cirurgicamente retirados. O restante do cérebro, após pesado, era homogeneizado em 2,5 ml de solução salina.

Ao homogeneizado foram adicionados 2,5 ml de TCA 0,6 N para a desproteínezado. Após centrifugação a 5.000 g por 10 minutos em centrífuga refrigerada Sorval RC 2 B, foi recolhido o sobrenadante.

As amostras foram conservadas à temperatura de -20°C até sua utilização.

5. Dosagens

As dosagens de fenilalanina, tirosina e triptofânio em sobrenadante desproteinizado de soro e cérebro foram realizadas por métodos fluorimétricos. A α -metilfenilalanina não interfere nem reage com esta técnica quantitativa (GREENGARD et alii, 1976).

5.1. Dosagem de Fenilalanina

Foi feita de acordo com o método fluorimétrico de McCAMAN & ROBINS (1962) com algumas modificações:

A) Reagentes:

Tampão Succinato 0,3 M pH 5,8 (Riedel)

Ninhidrina 30 mM (Merck)

L-Leucil, L-alanina 5 mM (Sigma)

TCA 0,3 N (Sigma)

Carbonato de sódio anidro 1,6 g% (Reagen)

Tartarato duplo de sódio e potássio 0,1 g% (Merck)

Sulfato de cobre 0,6 g% (Merck)

L-Fenilalanina (Sigma): soluções padrões correspondentes a 2,4 e 6 mg%

B) Método

A cada 25 μ l de sobrenadante de soro ou cérebro desproteinizados ou dos padrões de L-fenilalanina foram adicionados 400 μ l da mistura reagente: tampão succinato 0,3 M, pH 5,8; ni

nhidrina 30 mM e L-leucil, L-alanina 5 mM na proporção de 5:2:1. Para soro de animais que receberam administração de fenilalanina 4 g% foram utilizados 10 µl de sobrenadante desproteínizado, sendo o volume completado pela adição de 15 µl de TCA 0,3 N.

A mistura foi aquecida por 120 minutos a 60°C e resfriada com água corrente. Após, foram adicionados 2,5 ml de reagente cúprico, que é composto de: carbonato de sódio anidro 1,6 g%, tartarato duplo de sódio e potássio 0,1 g%, sulfato de cobre 0,6 g% em água, em igual proporção, e deixados em repouso de 10 a 15 minutos. A leitura das fluorescências foi feita em seguida, em fluorímetro TURNER modelo 111 com filtro primário 365 nm e secundários de 415 nm e 535 nm.

Todas as determinações foram realizadas em duplicatas, sendo repetidas quando a diferença entre ambos era superior a 5%. Para efeitos de cálculo, foram utilizadas as médias das duplicatas.

5.2. Dosagem de Tirosina

A dosagem de tirosina foi realizada de acordo com o método fluorimétrico de PHILIPS (1967), com algumas modificações:

A) Reagentes:

- TCA 0,3 N (Sigma)
- Ácido nitroso 0,3 N (Merck)
- Nitrito de sódio 1% (J.T. Baker)
- l-nitroso 2-naftol 0,1% (Merck)
- L-Tirosina (Merck): soluções padrões corresponden-

tes a 0,5; 1,0; 2,0 e 2,5 mg%

B) Método:

A 20 μ l de sobrenadante de soro ou cérebro desproteinizados ou das soluções padrões de L-tirosina foram adicionados 20 μ l de TCA 0,3 N e 5 ml de uma mistura reagente que é composta de ácido nitroso 0,3 N, nitrito de sódio 1 % e l-nitroso α -naftol 0,1 % na proporção de 10 : 0,05 : 1. Os tubos foram vedados e aquecidos em banho de água fervente por 10 minutos. Logo após terem sido retirados do banho, 3 ml de água destilada foram adicionados aos tubos, com agitação.

As leituras fluorimétricas foram feitas em fluorímetro TURNER modelo 111, utilizando como filtro primário 435 nm e secundário 535 nm.

Todas as dosagens foram feitas em duplicatas, sendo repetidas quando a diferença entre ambas superava 5 %. Para os cálculos foram utilizadas as médias das duplicatas.

5.3. Dosagem de Triptofânio

Dosagem feita de acordo com HESS & UDENFRIEND (1959)

A) Reagentes:

- Formaldeído 18 % (USP)
- Peróxido de hidrogênio 5 % (Carlo Erba)
- L-Triptofânio (Sigma): soluções padrões correspondentes a 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 mg%

B) Método:

Volumes de 10 μ l de sobrenadante desproteínizado de soro ou 40 μ l de sobrenadante desproteínizado de cérebro ou volumes equivalentes das soluções padrões de L-triptofânio foram adicionados de volume necessário de água para completar 3,0 ml. Após a adição de 0,1 ml de formaldeído 18 % foram aquecidos em banho de água fervente por 20 minutos. A cada tubo foi adicionado 0,1 ml de uma solução de peróxido de hidrogênio 5% e a mistura foi novamente aquecida por 20 minutos em água fervente.

As leituras das fluorescências foram feitas logo que as amostras esfriaram, à temperatura ambiente. Foram utilizados filtros primário de 365 μ m e secundário de 440 μ m, em fluorímetro TURNER modelo 111. Todas as dosagens foram realizadas em triplicatas, sendo usado o valor da mediana para efeitos de cálculo das concentrações.

5.4. Cálculo das Concentrações

Cada dosagem era acompanhada de uma curva padrão, sendo usado para fins de cálculos o quociente médio obtido pela curva. O cálculo final levou em consideração a diluição sofrida pelo soro e pelo cérebro durante o processo de preparação do sobrenadante desproteínizado. No caso do cérebro, foi usado o volume de 0,8 ml para cada grama de acordo com medidas previamente realizadas no laboratório.

6. Testes Comportamentais - Caracterização

Foram utilizados dois testes aversivos: esquiua ativa de 2 vias e esquiua inibitória; e um teste não aversivo, o teste de campo aberto.

Um intervalo de 24 horas separou treino e teste.

6.1. Esquiua Ativa de 2 Vias

Foram utilizadas caixas automáticas de condicionamento medindo 50 cm de largura, 25 cm de altura e 25 cm de profundidade. As caixas possuem quatro paredes de acrílico escuro e uma tampa do mesmo material. A base da caixa é constituída por barras de bronze de 2 mm de diâmetro, separadas por um espaço de 1 cm e estão ligadas a um gerador de corrente elétrica. No meio da caixa existe uma barra de madeira de 5 mm de largura, separando o piso em dois compartimentos. A iluminação é feita na parede posterior, existindo um sistema de células foto-elétricas na parede frontal permitindo ao controle automático indicar o lado da caixa em que se encontra o animal. Nas paredes laterais existem alto-falantes ligados a um gerador de tons do controle automático. Os animais foram colocados delicadamente de frente para o canto posterior esquerdo da caixa. Antes de iniciar o treino ou o teste, havia um período de 5 minutos para a habituação do animal ao novo ambiente, durante o qual ele realizava intensa atividade exploratória. Após aquele tempo, a campanha soava a intervalos de 10 a 50 segundos durante 5 segundos, no máximo, de cada vez. Ao término de cada período sonoro, uma cor-

rente elétrica de 0,8 mA de intensidade passava pelas barras de bronze no lado da caixa onde o rato se encontrava. O animal recebia choques nas patas até que cruzasse a metade da caixa e, então, o choque era omitido.

Esta resposta é chamada "fuga ao choque elétrico". Se o animal cruzasse a metade da caixa ao ouvir a campainha, esta parava imediatamente e o animal não recebia choque, sendo, então, chamado de "resposta condicionada de esquivas ao choque elétrico" ou "cruzamento com campainha" (CCC). O cruzamento sem estímulo auditivo ou aversivo foi denominado "cruzamento interprova" (CIP).

Durante cada experimento o animal era submetido a 50 tons durante um período de aproximadamente 25 minutos.

O crescente número de respostas com campainha foi utilizado como manifestação do aprendizado (melhora do desempenho) (SOUZA, 1980) e a diferença teste-treino foi considerada indicativo de memória.

6.2. Esquiva Inibitória

Os testes foram realizados em caixa de madeira envernizada, medindo 50 cm de comprimento por 25 cm de largura e 25 cm de altura. A caixa possui uma face frontal de vidro e assoalho com barras de bronze de 2 mm, espaçadas de 1 cm e ligadas a um gerador de corrente elétrica. Em um dos cantos, o assoalho é coberto por uma plataforma de madeira medindo 6 cm de largura por 4 cm de altura.

Tanto no treino quanto no teste os animais eram colocados delicadamente sobre a plataforma, de frente para o canto

posterior esquerdo da caixa.

Com cronômetro foi medido o tempo de latência até a descida do animal da plataforma para as barras de bronze. No treino, os animais recebiam choques de 0,2 mA ou 0,3 mA continuamente até subirem novamente na plataforma. No teste, os choques eram omitidos.

A diferença de latência no treino-teste (NETTO, 1984) foi tomada como medida de retenção (memória), sendo estabelecido o valor limite de 180 segundos.

6.3. Campo Aberto

Para os testes de campo aberto foi usada uma caixa de madeira envernizada, medindo 50 cm de altura, 60 cm de largura e 40 cm de profundidade. O assoalho da caixa é coberto por paviflex, dividido em 12 quadrados simétricos. O animal era colocado de frente para o canto posterior esquerdo da caixa. Cada animal explorava o ambiente por 2 minutos. Foram anotados o número de cruzamentos de um quadrado para o outro e também o número de vezes em que os animais apresentaram o comportamento de "rearing" (elevação das patas dianteiras, cabeça e tronco).

O aprendizado em campo aberto foi assumido como a redução do número de "rearings" (NETTO et alii, 1986) e de cruzamentos entre a sessão de treino e teste.

7. Experimentos Realizados

7.1. Efeitos da Administração Intraperitoneal de Fenilalanina 4 g% em Salina nos Níveis Séricos e Cerebrais de Fenilalanina, Tirosina e Triptofânio

Ratos provenientes de uma mesma ninhada receberam administração intraperitoneal de solução salina ou de fenilalanina 4 g% em salina conforme anteriormente descrito. Os animais eram sacrificados após 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 210 minutos. O soro era recolhido e o cérebro removido para determinação de fenilalanina, tirosina e triptofânio.

7.2. Efeitos da Administração Subcutânea de α -Metilfenilalanina 1,43 g% em Salina nos Níveis Séricos e Cerebrais de Fenilalanina, Tirosina e Triptofânio

Ratos provenientes da mesma ninhada receberam administração subcutânea de α -metilfenilalanina conforme indicado. Após 20 horas, quando a inibição da fenilalanina hidroxilase (GREENGARD, 1976) é máxima, receberam solução salina intraperitonealmente e foram sacrificados após 30, 60, 90, 120 e 210 minutos. Fenilalanina, tirosina e triptofânio foram determinados no soro e no cérebro.

7.3. Efeitos da Administração Subcutânea de α -Metilfenilalanina 1,43 g% em Salina e Intraperitoneal de Fenilalanina 3,6 g% em Salina nos Níveis Séricos e Cerebrais de Fenilalanina, Tirosina e Triptofânio

Ratos provenientes de uma mesma ninhada receberam α -metilfenilalanina subcutaneamente e, após 20 horas, fenilalanina intraperitonealmente. Os animais foram sacrificados após 30, 60, 90, 120 e 210 minutos para determinação de fenilalanina, tirosina e triptofânio no soro e no cérebro.

7.4. Efeitos da Administração Intraperitoneal de Fenilalanina 4 g% em Salina no Comportamento de Ratos em Esquiva Ativa de 2 Vias Submetidos a Choque Elétrico de 0,8 mA

7.4.1. Grupo Controle

Administração intraperitoneal de solução salina (2,5 ml . 100 g⁻¹ de peso corporal) 60 minutos antes do treino e 60 minutos antes do teste (SAL-SAL).

7.4.2. Grupos Experimentais

Foram estudados 3 grupos experimentais:

a) Administração intraperitoneal de salina (2,5 ml . 100 g⁻¹ de peso corporal) 60 minutos antes do treino e fenilalanina

4 g% em salina ($100 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal) 60 minutos antes do teste (SAL-FEN);

b) Administração intraperitoneal de fenilalanina 4 g% em salina ($100 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal) 60 minutos antes do treino e 60 minutos antes do teste (FEN-FEN);

c) Administração intraperitoneal de fenilalanina 4 g% em salina ($100 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal) 60 minutos antes do treino e de salina ($2,5 \text{ ml} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal) 60 minutos antes do teste (FEN-SAL).

7.5. Efeitos da Administração Intraperitoneal de Fenilalanina 4 g% em Salina no Comportamento de Ratos em Esquiva Inibitória Submetidos a Choque Elétrico de 0,3 mA

7.5.1. Grupos Controles

a) Administração intraperitoneal de solução salina na dose de $2,5 \text{ ml} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal 60 minutos antes do treino e do teste e simulação (picada de agulha) imediatamente após o treino. (S.Ag.S.)

b) Administração intraperitoneal de solução salina na dose de $2,5 \text{ ml} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal logo após o treino e simulação 60 minutos antes do treino e 60 minutos antes do teste. (Ag.S.Ag.)

7.5.2. Grupos Experimentais

Foram estudados 4 grupos experimentais:

a) Administração intraperitoneal de fenilalanina 4 g% em salina imediatamente após o treino e simulação 60 minutos antes do treino e antes do teste. (Ag.F.Ag)

b) Administração intraperitoneal de solução salina (2,5 ml . 100 g⁻¹ de peso corporal) 60 minutos antes do treino, de fe nilalanina 4 g% em salina (100 mg . 100 g⁻¹ de peso corporal) 60 minutos antes do teste e simulação imediatamente após o treino. (S.Ag.F.)

c) Administração intraperitoneal de fenilalanina 4 g% em salina (2,5 ml . 100 g⁻¹ de peso corporal) 60 minutos antes do treino, de salina (2,5 ml . 100 g⁻¹ de peso corporal) 60 minutos antes do teste e simulação imediatamente após o treino. (F.Ag. S.)

d) Administração intraperitoneal de fenilalanina 4 g% em salina (100 mg . 100 g⁻¹ de peso corporal) 60 minutos antes do treino e antes do teste e simulação imediatamente após o treino. (F.Ag.F.)

7.6. Efeitos da Administração Intraperitoneal de Feni- lalanina 4 g% em Salina no Comportamento de Ratos em Esquiva Inibitória Submetidos a Choque Elétrico de 0,2 mA

Foram organizados um grupo controle (S.Ag.S.) e um grupo experimental (F.Ag.S.), similares aos delineados para a es-

quiva inibitória com choque de 0,3 mA.

7.7. Efeitos da Administração Intraperitoneal de Fenilalanina 4 g% em Salina antes do Treino e Antes do Teste no Comportamento de Ratos em Campo Aberto

7.7.1. Grupo Controle

Administração intraperitoneal de solução salina (2,5 ml . 100 g⁻¹ de peso corporal) 60 minutos antes do treino e 60 minutos antes do teste. (SAL-SAL)

7.7.2. Grupos Experimentais

Foram estudados 3 grupos experimentais:

a) Administração intraperitoneal de solução salina (2,5 ml . 100 g⁻¹ de peso corporal) 60 minutos antes do treino e fenilalanina 4 g% em salina (100 mg . 100 g⁻¹ de peso corporal) 60 minutos antes do teste. (SAL-FEN)

b) Administração intraperitoneal de fenilalanina 4 g% em salina (100 mg . 100 g⁻¹) de peso corporal) 60 minutos antes do treino e 60 minutos antes do teste. (FEN-FEN)

c) Administração intraperitoneal de fenilalanina 4 g% em salina (100 mg . 100 g⁻¹ de peso corporal) 60 minutos antes do treino e de solução salina (2,5 ml . 100 g⁻¹ de peso corporal) 60 minutos antes do teste. (FEN-SAL)

7.8. Efeitos da Administração Intraperitoneal de Fenilalanina 4 g% em Salina Após o Treino no Comportamento de Ratos em Campo Aberto

7.8.1. Grupo Controle

Administração intraperitoneal de solução salina (2,5 ml . 100 g⁻¹ de peso corporal) imediatamente após o treino e simulação 60 minutos antes do treino e antes do teste. (Ag.S.Ag.)

7.8.2. Grupo Experimental

Administração intraperitoneal de fenilalanina 4 g% em salina (100 mg . 100 g⁻¹ de peso corporal) imediatamente após o treino e simulação 60 minutos antes do treino e antes do teste. (Ag.F.Ag.)

7.9. Efeitos da Administração Subcutânea de α -Metilfenilalanina 1,43 g% em Salina e Intraperitoneal de Fenilalanina 3,6 g% em Salina Antes do Treino no Comportamento de Ratos em Campo Aberto

7.9.1. Grupo Controle

Administração subcutânea de solução salina (3,0 ml . 100 g⁻¹ de peso corporal), 21 horas antes do treino; administração intraperitoneal de solução salina (2,5 ml . 100 g⁻¹ de peso corporal) 60 minutos antes do treino e antes do teste. (SAL-SAL)

7.9.2. Grupos Experimentais

Foram estudados 2 grupos experimentais:

a) Administração subcutânea de α -metilfenilalanina 1,43 g% em salina (43 mg . 100 g⁻¹ de peso corporal), 21 horas antes do treino; administração intraperitoneal de solução salina (2,5 ml . 100 g⁻¹ de peso corporal) 60 minutos antes do treino e antes do teste. (α -SAL)

b) Administração subcutânea de α -metilfenilalanina 1,43 g% em salina (43 mg . 100 g⁻¹ de peso corporal), 21 horas antes do treino; administração de fenilalanina 3,6 g% em salina (90 mg . 100 g⁻¹ de peso corporal) 60 minutos antes do treino e de solução salina (2,5 ml . 100 g⁻¹ de peso corporal) 60 minutos antes do teste. (α -FEN)

7.10. Efeitos da Administração Intraperitoneal de β -bloqueador (Propranolol) e de Fenilalanina 4 g% em Salina Antes do Treino no Comportamento de Ratos em Campo Aberto

7.10.1 Grupo Controle

Administração intraperitoneal de solução salina (2,5 ml . 100 g⁻¹ de peso corporal), 60 minutos antes do treino e antes do teste.

7.10.2. Grupos Experimentais

Foram estudados 2 grupos experimentais:

a) Administração intraperitoneal de propranolol em salina (200 $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal), 60 minutos antes do treino e de solução salina (2,5 ml $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal) 60 minutos antes do teste. (β -SAL)

b) Administração intraperitoneal de propranolol em solução salina (200 $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal) e fenilalanina 4 g% em salina (100 mg $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal) 60 minutos antes do treino e de solução salina (2,5 ml $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal) 60 minutos antes do teste. (β -FEN)

8. Análise Estatística

As dosagens de aminoácidos estão expressas como média \pm erro padrão; as comparações entre grupo experimental e controle foram realizadas pelo teste "t" de Student (LEVIN, 1978).

Os dados comportamentais de esQUIVA ativa de 2 vias, campo aberto e esQUIVA inibitória (treino) também estão expressos como média \pm erro padrão e os grupos foram comparados por uma análise de variância de uma via, seguida do teste de raio múltiplo de Duncan (BLISS, 1967; DOWNE & HEAT, 1970). O desempenho dos vários grupos na esQUIVA inibitória são expressos como mediana e intervalos interquartis e foram comparados pelo teste de Mann-Whitney (SIEGEL, 1956) e teste de Mediana (LEVIN, 1978). Teste de Wilcoxon e do Sinal (SIEGEL, 1956) foram utilizados para a análise de significância da diferença treino-teste

de cada grupo experimental, na esquiua inibitória.

RESULTADOS

1. Dosagens

1.1. Efeitos da Administração Intraperitoneal de Fenilalanina 4 g% nos Níveis Séricos e Cerebrais de Fenilalanina, Tirosina e Triptofânio

Após a administração intraperitoneal de fenilalanina há uma rápida absorção do aminoácido, com elevação sérica máxima o correndo em 15 minutos. A queda é acentuada até os 120 minutos, voltando aos valores normais, mais lentamente, aos 210 minutos.

A curva sérica de tirosina é um pouco mais retardada, com o pico ocorrendo aos 60 minutos. Este atraso se deve basicamente ao fato de ser a tirosina formada por hidroxilação da fenilalanina, principalmente no fígado.

Os níveis séricos de triptofânio não apresentam variação significativa com a administração de fenilalanina em relação à administração de salina. Há uma pequena queda inicial, provavelmente devida à diluição ocasionada pela absorção da solução salina e posterior retorno aos níveis iniciais (Figura 5).

Em relação aos níveis cerebrais (Figura 6), observam-se aos 60 minutos as maiores elevações de fenilalanina e as me

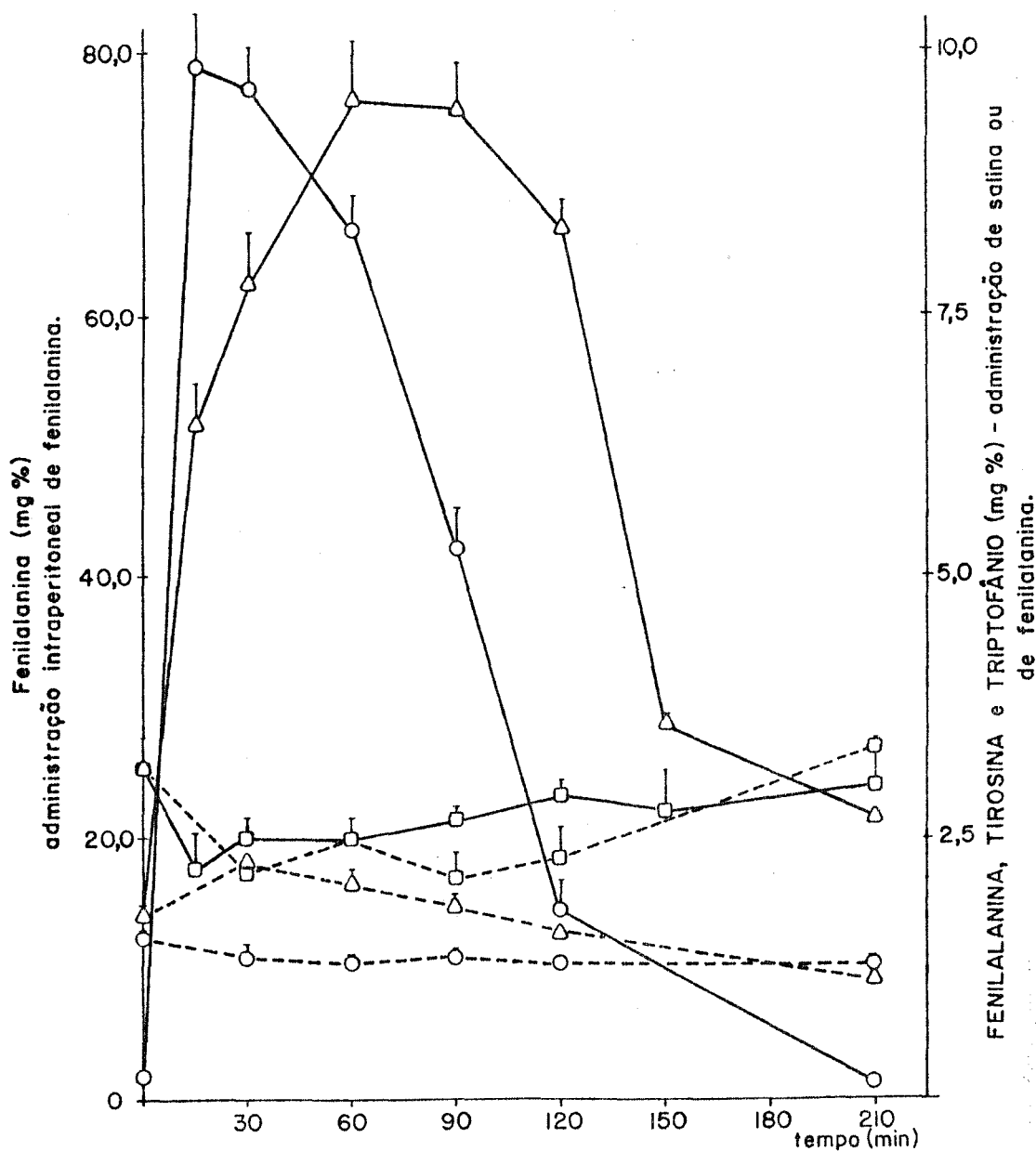


FIGURA 5. Níveis séricos de fenilalanina, tirosina e triptofânio (média e erro padrão) após a administração intraperitoneal de salina ou fenilalanina 4 g% em salina.

- administração de fenilalanina 4 g% em salina, na dose de $100 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal.
 - - - administração de solução salina 0,85 g% na dose de $2,5 \text{ ml} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal.

o fenilalanina Δ tirosina \square triptofânio

* Cada ponto representa a média dos resultados com 6 a 21 animais. (Ver Apêndice).

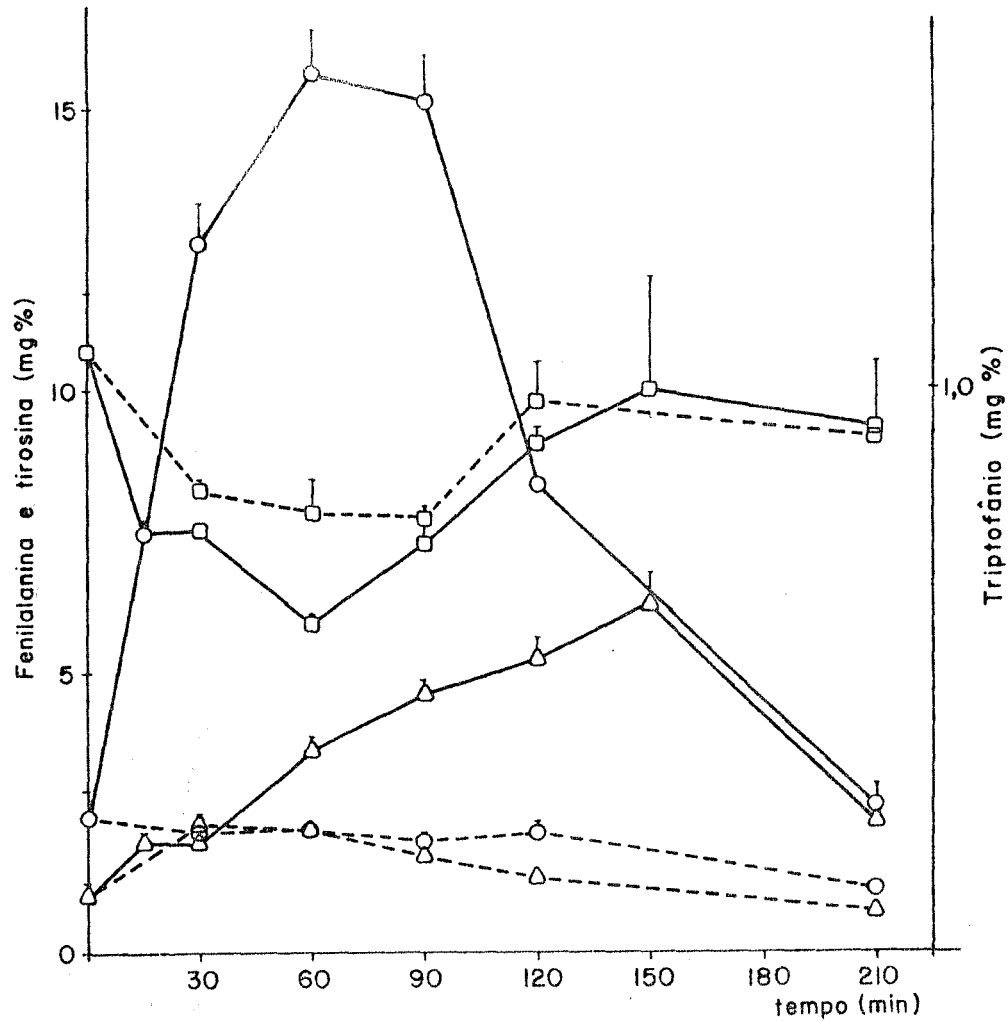


FIGURA 6. Níveis cerebrais de fenilalanina, tirosina e triptofânio (média e erro padrão) após a administração intraperitoneal de solução salina ou de fenilalanina 4 g% em salina.

- administração de fenilalanina 4 g% em salina, na dose de $100 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal.
- - - administração de solução salina 0,85 g% na dose de $2,5 \text{ ml} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal.

○ fenilalanina Δ tirosina □ triptofânio

* Cada ponto representa a média dos resultados com 6 a 21 animais (Ver Apêndice).

nores concentrações de triptofânio. O pico máximo de tirosina só ocorre mais tarde, aos 150 minutos.

Comparando ao grupo controle, aos 60 minutos, os níveis cerebrais de fenilalanina aumentam cerca de 7 vezes, os de tirosina quase 70% e os de triptofânio decrescem 25%, as duas primeiras estatisticamente significantes.

No soro, o aumento de fenilalanina é aproximadamente 50 vezes e o de tirosina cerca de 5 vezes, enquanto os níveis séricos de triptofânio não se alteram (Tabela I).

Foram comparados os níveis séricos e cerebrais de fenilalanina e tirosina entre machos e fêmeas, aos 60 minutos após a administração intraperitoneal de fenilalanina 4 g% em salina. Foi usado um teste não paramétrico para esta comparação, visto que não há dispersão de dados em torno de uma média. Pelo teste da mediana não foram encontradas diferenças significativas. Isto sugere que a atividade da enzima fenilalanina hidroxilase hepática não difere em relação ao sexo, pelo menos na idade em que os animais foram utilizados.

FREEDLAND et alii (1962) também não encontraram diferença entre machos e fêmeas na atividade daquela enzima em ratos albinos com aproximadamente 40 dias de idade.

1.2. Efeitos da Administração Subcutânea de α -Metilfenilalanina nos Níveis Séricos e Cerebrais de Fenilalanina, Tirosina e Triptofânio

Após 20 horas da administração subcutânea de α -metilfenilalanina, há elevação nas concentrações séricas da fenilalanina

na e decréscimo de 40 % nos níveis de tirosina em relação à administração de salina. Isto se deve à parcial inibição da reação de conversão de fenilalanina para tirosina. Os níveis de triptofânio no soro não apresentam variações significativas em relação ao controle (Figura 7).

Aos 60 minutos, os níveis séricos de fenilalanina e tirosina atingem valores normais.

No cérebro, os níveis de fenilalanina não diferem do controle, há decréscimos de 75% nos níveis de tirosina e elevação significativa nos níveis de triptofânio (Figura 8) (Tabela I).

Aos 210 minutos, apenas os níveis de fenilalanina permanecem alterados.

1.3. Efeitos da Administração Subcutânea de α -Metilfenilalanina e Intraperitoneal de Fenilalanina 3,6 g% em Salina nos Níveis Séricos e Cerebrais de Fenilalanina, Tirosina e Triptofânio

Após a administração intraperitoneal de fenilalanina, ocorre elevação sérica máxima nos níveis deste aminoácido em 30 minutos. A queda é acentuada até 120 minutos, voltando aos valores normais, mais lentamente, aos 210 minutos.

As concentrações séricas máximas de tirosina se apresentam aos 60 minutos, ocorrendo queda até valores normais aos 210 minutos.

Os níveis séricos e cerebrais de triptofânio não apresentam variações significativas com administração de fenilalanina

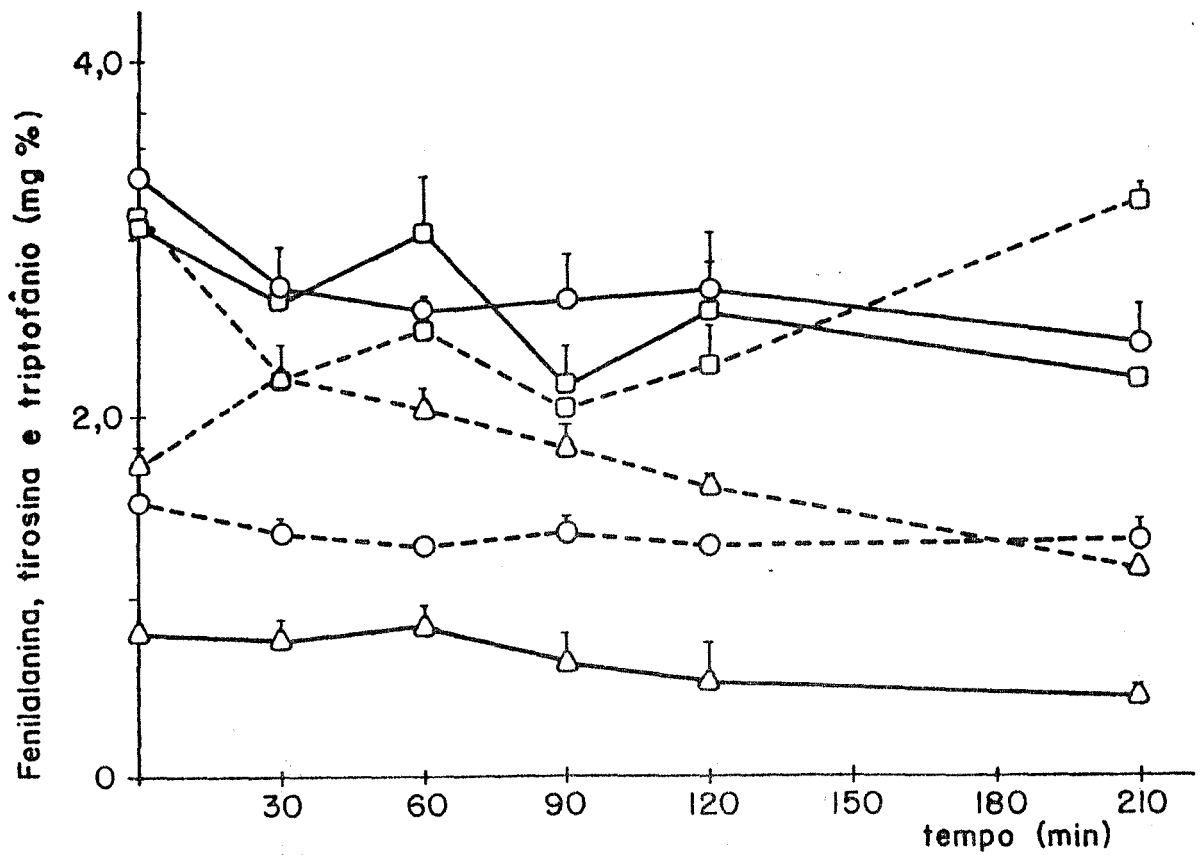


FIGURA 7. Níveis séricos de fenilalanina, tirosina e triptofânio após administração intraperitoneal de solução salina apenas ou com prévia administração subcutânea de α -metilfenilalanina (Média \pm erro padrão).

— administração de solução salina a 0,85 g% na dose de 2,5 ml.100 g⁻¹ de peso corporal com prévia administração subcutânea de α -metilfenilalanina.

----- administração de solução salina 0,85 g% na dose de 2,5 ml.100 g⁻¹, de peso corporal.

o fenilalanina Δ tirosina \square triptofânio

* Cada ponto representa a média dos resultados com 3 a 9 animais. (Ver Apêndice).

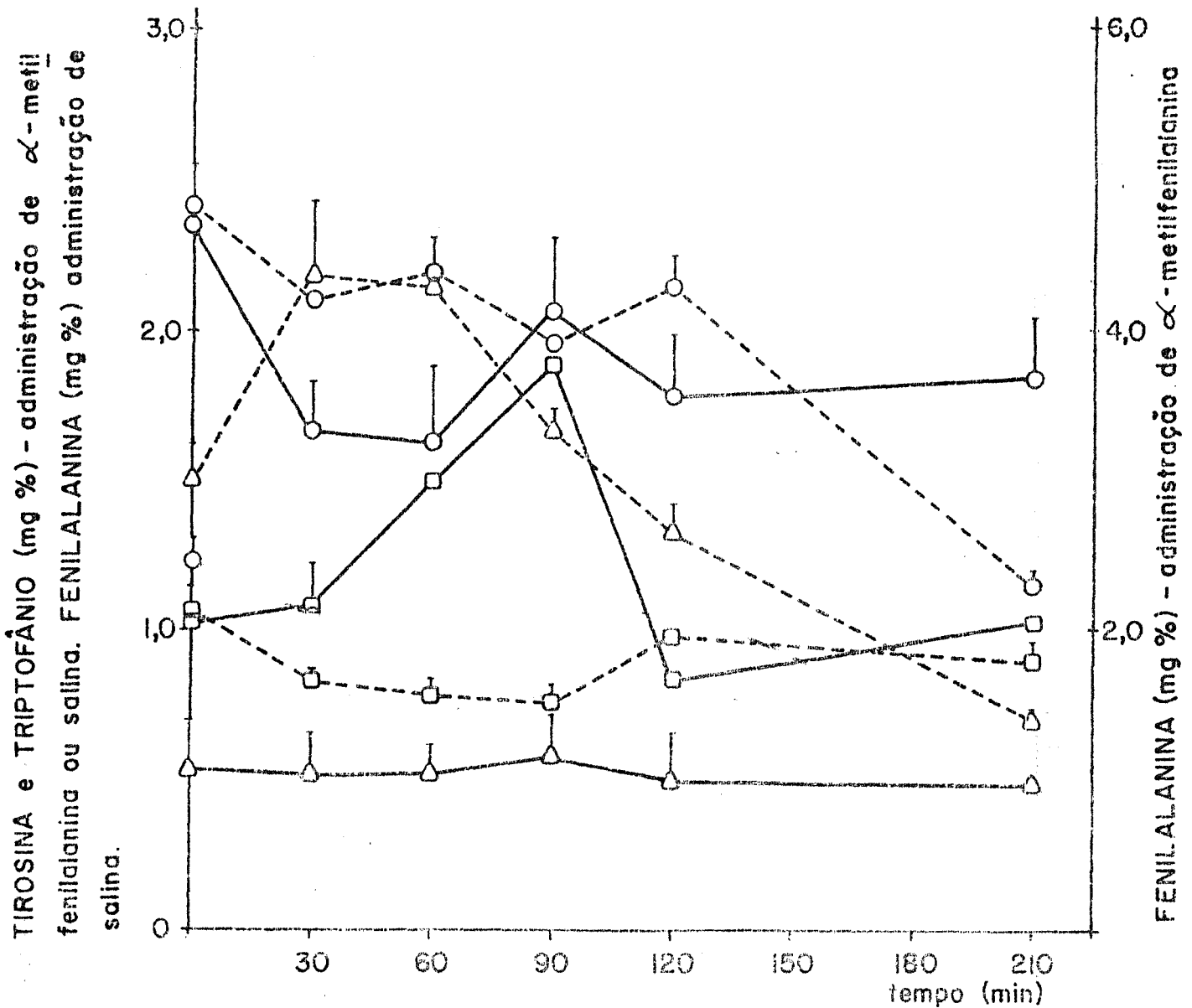


FIGURA 8. Níveis cerebrais de fenilalanina, tirosina e triptofânio após administração intraperitoneal de solução salina apenas, ou com prévia administração de α -metilfenilalanina. (Média \pm erro padrão).

— administração de solução salina 0,85 g% na dose de 2,5 ml.100 g⁻¹ de peso corporal com prévia administração subcutânea de α -metilfenilalanina.

- - - administração de solução salina 0,85 g% na dose de 2,5 ml.100 g⁻¹ de peso corporal.

o fenilalanina Δ tirosina \square triptofânio

* Cada ponto representa a média dos resultados com 3 a 9 animais. (Ver Apêndice).

na em relação à administração de salina (Figuras 9 e 10).

Em comparação ao grupo controle aos 60 minutos, há aumento de aproximadamente 5 vezes nos níveis cerebrais de fenilalanina e decréscimo significativo nos níveis cerebrais de tirosina (Figura 10). No soro, os níveis de fenilalanina aumentam cerca de 49 vezes, com aumento significativo nos níveis de tirosina. Os níveis séricos e cerebrais de fenilalanina atingidos são iguais aos encontrados no grupo fenilalanina 4 g%, enquanto os níveis de tirosina são significativamente mais baixos neste experimento, no qual a enzima fenilalanina hidroxilase hepática foi parcialmente inibida (Tabela I).

Através das dosagens de fenilalanina, tirosina e triptofânio no cérebro e soro de ratos com hiperfenilalaninemia experimental, com ou sem inibição parcial da fenilalanina hidroxilase hepática, foi observado que entre 60 e 90 minutos após a administração das drogas ocorrem as maiores alterações cerebrais simultâneas daqueles aminoácidos. A partir destes dados, os estudos de comportamento foram realizados 60 minutos após a administração de fenilalanina ou de salina.

2. Comportamento

2.1. Efeitos da Administração Intraperitoneal de Fenilalanina 4 g% em Salina no Comportamento de Ratos em Esquiva Ativa de 2 Vias Submetidos a Choque Elétrico de 0,8 mA

No treino, os animais hiperfenilalaninêmicos obtiveram

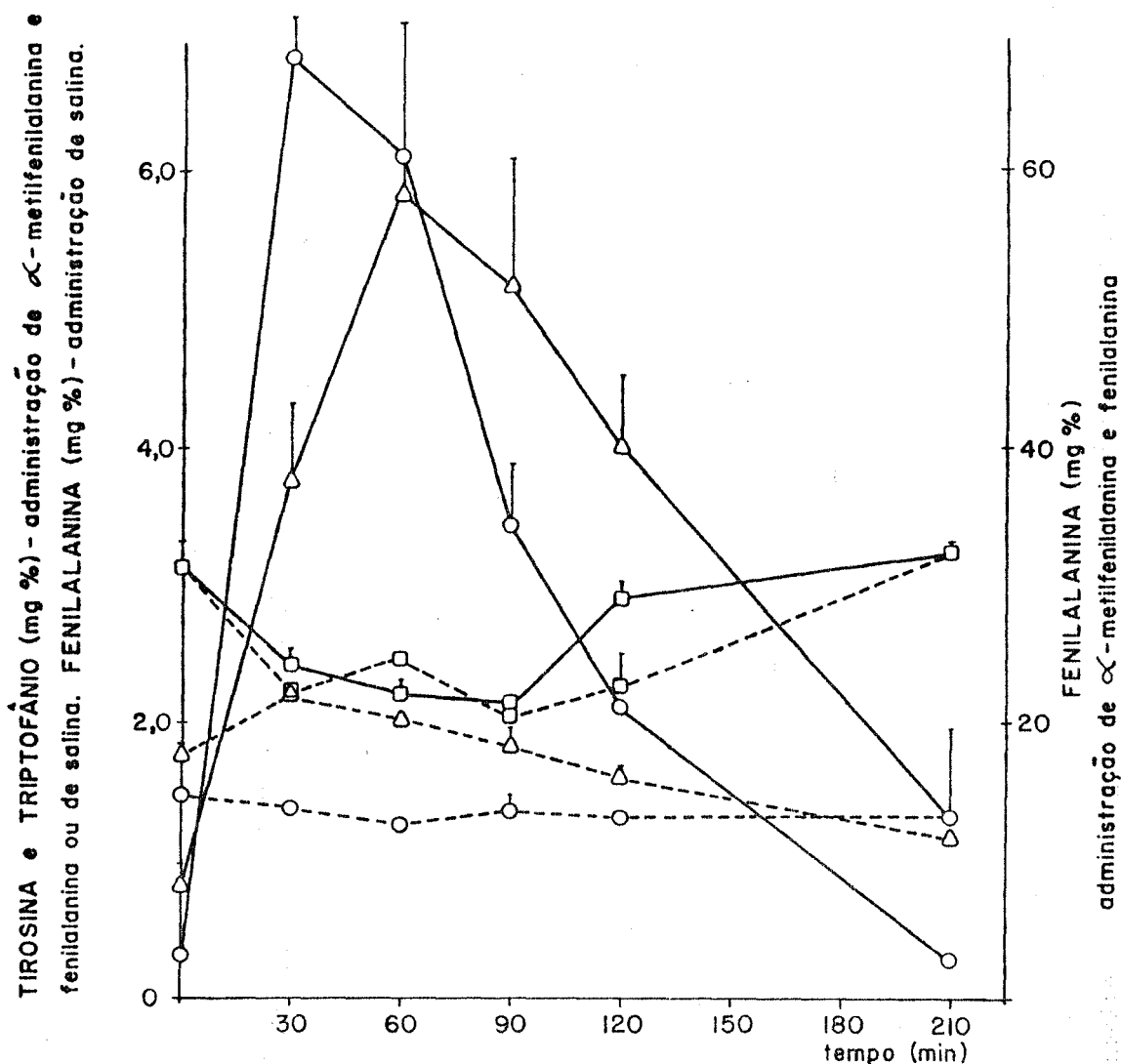


FIGURA 9. Níveis séricos de fenilalanina, tirosina e triptofânio (média \pm erro padrão) após administração intraperitoneal de fenilalanina 3,6 g% em salina (com prévia administração subcutânea de α -metilfenilalanina) ou de solução salina.

———— administração de fenilalanina 3,6 g% em salina, na dose de 90 mg.100 g⁻¹ de peso corporal.

----- administração de solução salina 0,85 g% na dose de 2,5 ml.100 g⁻¹ de peso corporal.

o fenilalanina Δ tirosina \square triptofânio

* Cada ponto representa a média dos resultados com 4 a 11 animais. (Ver Apêndice).

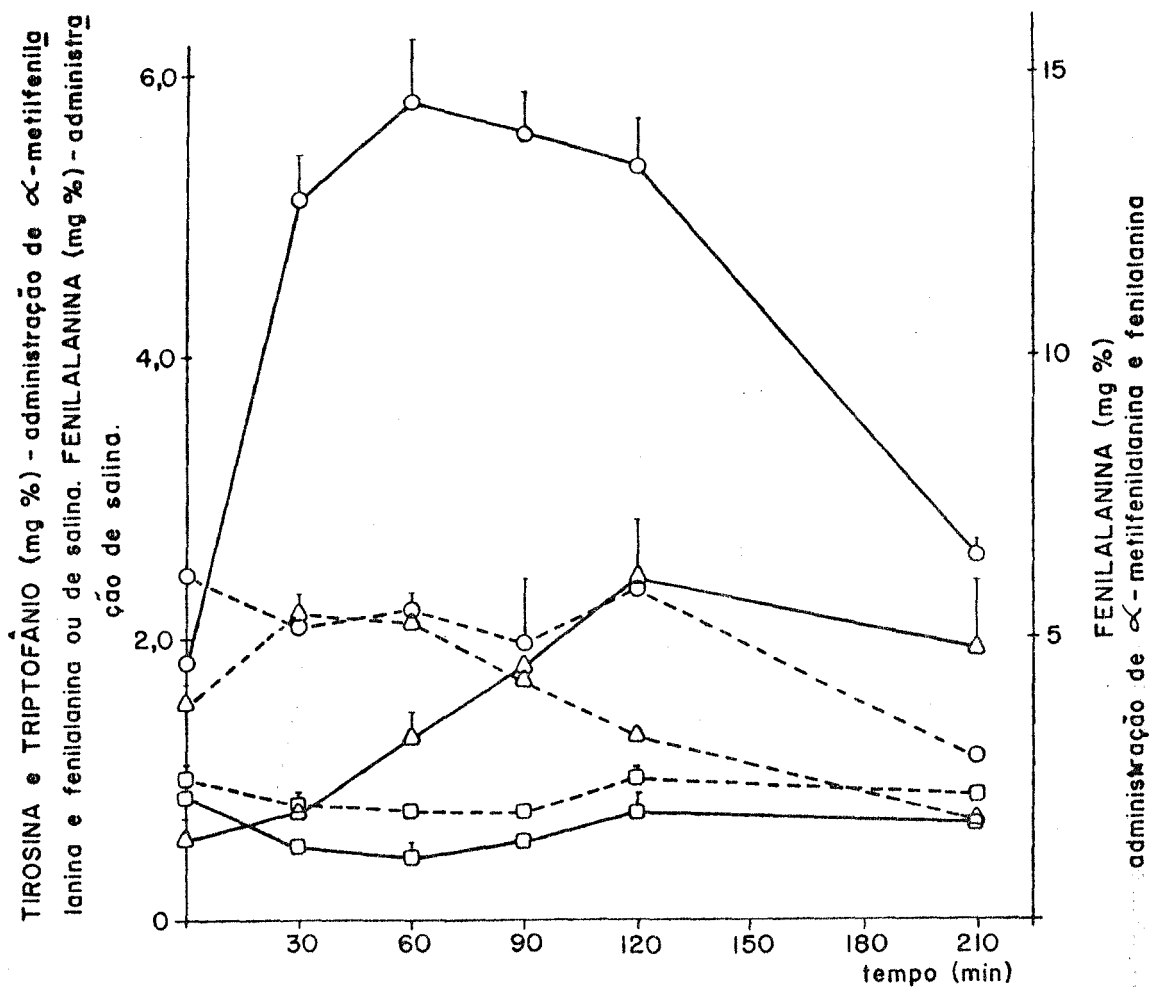


FIGURA 10. Níveis cerebrais de fenilalanina, tirosina e triptofânio (média \pm erro padrão) após administração intra peritoneal de fenilalanina 3,6 g% em salina (com prévia administração subcutânea de α -metilfenilalanina) ou de solução salina.

———— administração de fenilalanina 3,6 g% em salina, na dose de $90 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal.

----- administração de solução salina 0,85 g% de $2,5 \text{ ml} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal.

o fenilalanina Δ tirosina triptofânio

* Cada ponto representa a média dos resultados com 4 a 11 animais. (Ver Apêndice).

TABELA I. Níveis séricos e cerebrais de fenilalanina, tirosina e triptofânio nos vários grupos experimentais, 60 minutos após a administração de salina, fenilalanina 4 g% ou fenilalanina 3,6 g%.

TRATAMENTOS ^{a,b}	AMINOÁCIDOS	CÉREBRO		SORO	
		Salina	Fenilalanina	Salina	Fenilalanina
		(A)	4 g% (C)	(A)	4 g% (C)
Sem metilfenilalanina	PHE	2,19 ± 0,13(8)	15,58 ± 0,63(10)	1,29 ± 0,05(8)	66,50 ± 2,93(9)
	TYR	2,15 ± 0,14(8)	3,58 ± 0,16(8)	2,04 ± 0,14(8)	9,55 ± 0,73(8)
	TRP	0,78 ± 0,05(8)	0,59 ± 0,11(9)	2,50 ± 0,14(7)	2,49 ± 0,19(8)
		(B)	3,6 g% (D)	(B)	3,6 g% (D)
Com metilfenilalanina	PHE	3,27 ± 0,25(5)	14,48 ± 1,02(6)	2,61 ± 0,10(5)	61,51 ± 3,02(5)
	TYR	0,52 ± 0,10(5)	1,30 ± 0,30(6)	0,85 ± 0,14(5)	5,84 ± 1,32(5)
	TRP	1,51 ± 0,39(5)	0,44 ± 0,14(6)	3,06 ± 0,33(5)	2,23 ± 0,06(6)
Teste de DUNCAN ^c	PHE	C > A e B; D > A e B		C > A e B; D > A e B	
	TYR	C > A; B; D; A > B e D; D > B		B < C e D; A < C e D	
	TRP	C < B; D < B		D < B	

a - Os grupos estão descritos em Material e Métodos. Entre parêntesis, o número de animais.

b - Os resultados estão expressos em mg% (média ± erro padrão).

c - Teste de Duncan entre grupos: significativa a nível de 5%.

número de cruzamentos com campainha (CCC) e de cruzamento interprova (CIP) inferiores aos dos animais controles.

No teste, o grupo com administração intraperitoneal de fenilalanina pré-treino e salina pré-teste (FEN-SAL) e o grupo controle (SAL-SAL) não diferiram significativamente em relação ao número de cruzamento com campainha (CCC) ou interprova (CIP); os grupos que receberam administração de fenilalanina pré-treino e pré-teste (FEN-FEN) e salina pré-treino e fenilalanina pré-teste (SAL-FEN) também tiveram desempenho similar tanto em cruzamentos com campainha (CCC) quanto em cruzamentos interprova (CIP). Portanto, o desempenho no teste não parece ser influenciado pelo tratamento antes do treino.

Também no teste, o grupo salina pré-treino e fenilalanina pré-teste (SAL-FEN) não é estatisticamente diferente dos grupos fenilalanina pré-treino e salina pré-teste (FEN-SAL) e fenilalanina pré-treino e pré-teste (FEN-FEN).

Todos os grupos evidenciaram memória. Contudo, houve correlação entre o crescimento no número de respostas com campainha (CCC) e de cruzamentos interprova (CIP) ($r = 0,4486$; $P < 0.01$), no grupo controle (Tabela II). Com estes resultados, não é possível excluir relação de causa e efeito entre os dois componentes da tarefa, o cruzamento com campainha (CCC) e o cruzamento interprova (CIP). Deste modo, o menor desempenho no cruzamento com campainha (CCC) dos animais hiperfenilalaninêmicos pode ser causado por depressão de atividade motora e não por influência em alguma fase da cadeia de eventos que leva da aquisição à evocação da memória.

A fim de ser isolada uma destas variáveis inseparáveis

TABELA II. Desempenho em esquiwa ativa de 2 vias de ratos tratados com administração intra peritoneal de 2,5 ml . 100g⁻¹ de peso corporal de salina ou fenilalanina 4 g% em salina. Antes do treino e antes do teste.

TRATAMENTO ^a	TREINO ^b		TESTE ^b		Δ (TREINO-TESTE) ^b	
	CCC	CIP	CCC	CIP	CCC	CIP
A - SAL-SAL (35)	16,17 ± 1,53	14,51 ± 1,58	29,40 ± 1,95	33,80 ± 3,30	13,23 ± 1,39 ^d	19,28 ± 2,88 ^d
B - SAL-FEN (34)	14,20 ± 1,61	13,47 ± 1,27	20,74 ± 2,37	21,06 ± 2,05	6,53 ± 1,88 ^e	7,59 ± 2,18 ^e
C - FEN-SAL (34)	10,44 ± 1,19	9,44 ± 0,97	23,26 ± 1,83	29,38 ± 3,22	12,82 ± 1,53 ^d	19,94 ± 2,91 ^d
D - FEN-FEN (31)	9,06 ± 1,21	9,42 ± 0,81	16,71 ± 2,37	18,45 ± 1,51	7,65 ± 1,52 ^d	9,03 ± 1,72 ^d
A + B	15,20 ± 1,09	14,00 ± 1,01	-	-	-	-
C + D	9,68 ± 0,85	9,43 ± 0,63	-	-	-	-
A+B x C+D	P < 0.001	P < 0.001	A > B e D	A > B e D	A > B e D	A > B e D
Teste "t" ^c : A x B	n.s.	n.s.	f:	C > D		
C x D	n.s.	n.s.			C > B e D	C > B e D

a - Os grupos estão descritos em Material e Métodos,

(entre parêntesis, o número de ratos)

b - Os resultados estão expressos em média ± erro padrão

c - Teste "t" para amostras independentes entre tratamentos

d - Teste "t" para amostras dependentes em cada tratamento: significante para p < 0,001

e - Teste "t" para amostras dependentes em cada tratamento: significante para p < 0,01

f - Teste DUNCAN, entre grupos: significante a nível de 5%

na esQUIVA ativa de 2 vias, pois é um teste que requer agilidade para a esQUIVA ao choque elétrico, foram realizados experimentos em esQUIVA inibitória, teste comportamental também aversivo, em que o desempenho não está, necessariamente, ligado à atividade motora.

2.2. Efeitos da Administração Intraperitoneal de Fenilalanina 4 g% em Salina no Comportamento de Ratos em EsQUIVA Inibitória Submetidos a Choque Elétrico de 0,3 mA

Os grupos controles e experimentais têm memória significativa e não diferem entre si. Portanto, em esQUIVA inibitória, com choque elétrico de baixa intensidade (0,3 mA), o estado de hiperfenilalaninemia não parece interferir na memória dos animais (Tabela III).

2.3. Efeitos da Administração Intraperitoneal de Fenilalanina 4 g% em Salina no Comportamento de Ratos em EsQUIVA Inibitória Submetidos a Choque Elétrico de 0,2 mA

Considerando que o choque elétrico de 0,3 mA produzia uma resposta muito intensa no teste após 24 horas, foram realizados um grupo experimental (F.Ag.S) e um grupo controle (S.Ag.S) de ratos submetidos a choque elétrico de 0,2 mA. De maneira similar ao que ocorreu com o choque elétrico de 0,3 mA nos grupos A e C, os animais apresentaram memória significativa, que não

TABELA III. Desempenho em esquiua inibitória com choque elétrico de 0,3 mA de ratos tratados com administração intraperitoneal de 2,5 ml .100 g⁻¹ de peso corporal de solução salina 0,85 g% ou fenilalanina 4 g% em salina.

TRATAMENTO ^a	TREINO ^{b, c}	Δ TESTE-TREINO ^{d, g}
A - S.Ag.S. (10)	3,26 ± 0,62	58,59 (21,49/180,00) ^e
B - S.Ag.F. (11)	5,72 ± 0,83	73,79 (16,71/102,34) ^e
C - F.Ag.S. (11)	3,67 ± 0,59	15,78 (0,67/ 61,40) ^e
D - F.Ag.F. (10)	3,09 ± 0,41	7,24 (1,60/ 42,80) ^f
E - Ag.S.Ag (10)	4,98 ± 0,70	26,97 (0,23/112,05) ^f
F - Ag.F.Ag (12)	4,70 ± 0,62	33,25 (6,90/ 87,80) ^e

a - Os grupos estão descritos em Material e Métodos (entre parêntesis, o número de ratos).

b - Os resultados estão expressos em média ± erro padrão.

c - Teste DUNCAN entre os grupos: n.s.

d - Os resultados estão expressos em mediana (intervalos interquartis)

e - Teste do sinal e teste de Wilcoxon para Δ teste-treino em cada tratamento: significante para p < 0.01.

f - Teste do sinal e teste de Wilcoxon para Δ teste-treino em cada tratamento: significante para p < 0.05.

g - Teste da mediana e teste de Mann-Whitney para Δ teste-treino entre tratamentos: n.s.

diferiu entre os dois grupos (Tabela IV).

Não sendo possível qualquer diferenciação no desempenho dos animais experimentais e controles em esquivas inibitórias, foi utilizado um teste não aversivo, de campo aberto, visando de terminar se a condição de hiperfenilalaninemia interfere no aprendizado dos animais. Este teste possibilita também medida de atividade motora.

2.4. Efeitos da Administração Intraperitoneal de Fenilalanina 4 g% em Salina, Antes do Treino e Antes do Teste no Comportamento de Ratos em Campo Aberto

Os resultados mostram que os grupos controle e experimentais obtiveram mesmo número de cruzamentos e de "rearings" no treino. Isto sugere que a atividade motora e o comportamento exploratório dos animais não são afetados pela administração intraperitoneal de fenilalanina 4 g% em salina.

A diferença treino-teste (Δ) em cruzamento e "rearings" diferem entre os grupos. A administração intraperitoneal de fenilalanina pré-treino e pré-teste (FEN-FEN) e fenilalanina pré-treino e salina pré-teste (FEN-SAL) resulta em uma diferença entre treino e teste não significativa, tanto em número de cruzamentos quanto em número de "rearings" (Tabela V). Portanto, estes dois grupos experimentais não evidenciaram memória, sugerindo que a condição de hiperfenilalaninemia durante o treino não provoca alteração na atividade motora, mas pode influir em

TABELA IV. Desempenho em esQUIVA inibit6ria com choque el6trica de 0,2 mA de ratos tratados com administra76o intraperitoneal de 2,5 ml . 100 g⁻¹ de peso corporal de solu76o salina 0,85 g% ou fenilalanina 4 g% em salina.

TRATAMENTO ^a	TREINO ^{b, c}	Δ TESTE-TREINO ^{d, g}
A - S.Ag.S. (17)	5,11 \pm 0,64	28,06 (10,59/102,71) ^e
B - F.Ag.S. (20)	6,73 \pm 0,82	23,99 (-0,88/148,37) ^f

a - Os grupos est6o descritos em Material e M6todos (entre par6ntesis, o n6mero de ratos).

b - Os resultados est6o expressos em m6dia \pm erro padr6o.

c - Teste "t" entre os grupos: n.s.

d - Os resultados est6o expressos em mediana (intervalos interquartis)

e - Teste do sinal e teste de Wilcoxon para Δ teste-treino em cada tratamento: significante para $p < 0.001$.

f - Teste do sinal e teste de Wilcoxon para Δ teste-treino em cada tratamento: significante para $p < 0.1$.

g - Teste da mediana e teste de Mann-Whitney para Δ teste-treino entre tratamentos: n.s.

TABELA V. Desempenho em campo aberto de ratos tratados com administração intraperitoneal de 2,5 ml. 100 g⁻¹ de peso corporal de solução salina 0,85 g% ou de solução de fenilalanina 4 g% em salina antes do treino e antes do teste.

TRATAMENTO ^a	CRUZAMENTOS ^b			REARINGS ^b		
	Treino	Teste	Δ (Treino-Teste)	Treino	Teste	Δ (Treino-Teste)
A - SAL-SAL (23)	40,56 ± 1,90	32,87 ± 2,32	7,69 ± 1,98 ^c	9,04 ± 0,67	5,61 ± 0,71	3,65 ± 0,70 ^c
B - SAL-FEN (19)	40,89 ± 1,34	37,16 ± 1,64	3,73 ± 1,79 ^d	8,84 ± 0,46	7,79 ± 0,66	1,05 ± 0,43 ^d
C - FEN-SAL (18)	37,78 ± 2,05	38,94 ± 2,97	-1,17 ± 2,32	8,50 ± 0,84	8,16 ± 0,91	0,34 ± 1,03
D - FEN-FEN (13)	37,08 ± 1,34	39,85 ± 1,92	-2,77 ± 1,72	7,92 ± 0,50	8,39 ± 0,86	-0,46 ± 0,77
Teste de DUNCAN ^e :	n.s.	n.s.	A > C e D	n.s.	n.s.	A > C e D

a - Os grupos estão descritos em Material e Métodos (entre parêntesis, o número de ratos)

b - O desempenho está expresso em média, ± erro padrão.

c - Teste "t" para amostras dependentes: significativo para p < 0,001

d - Teste "t" para amostras dependentes: significativo para p < 0,05

e - Teste DUNCAN entre os grupos: significativo a nível de 5%

alguma fase da cadeia de eventos que leva da aquisição à evocação.

O grupo experimental salina pré-treino e fenilalanina pré-teste (SAL-FEN) demonstrou não diferir do grupo controle em relação à diferença treino-teste tanto em número de cruzamentos quanto em número de "rearings", sendo que estes dois grupos evidenciaram memória. Portanto, hiperfenilalaninemia parece não influenciar na evocação da tarefa mas afetar as fases de aquisição e/ou consolidação da mesma.

2.5. Efeitos da Administração Intraperitoneal de Fenilalanina 4 g% em Salina Após o Treino no Comportamento de Ratos em Campo Aberto

A administração de fenilalanina 4 g% em salina intraperitonealmente após o treino não possibilita a diferenciação do efeito sobre aquisição ou consolidação da tarefa; uma vez que a consolidação da memória em campo aberto parece prolongar-se por poucos minutos após o treino. Esta idéia é reforçada pelos resultados obtidos com o tratamento pós-treino, os quais mostram que não há diferença significativa no desempenho dos animais, sendo que ambos os grupos, com tratamento pós-treino e controles, evidenciaram memória (Tabela VI).

TABELA VI. Desempenho em campo aberto de ratos tratados com administração intraperitoneal de 2,5 ml. 100 g⁻¹ de peso corporal de solução salina 0,85 g% ou de fenilalanina 4 g% em salina após o treino.

TRATAMENTO ^a	CRUZAMENTOS ^b			REARINGS ^b		
	Treino	Teste	Δ (Treino-Teste)	Treino	Teste	Δ (Treino-Teste)
A - Ag.S.Ag (20)	36,65 ± 1,71	25,05 ± 3,84	11,60 ± 3,30 ^e	9,40 ± 0,73	6,60 ± 0,98	2,80 ± 1,07 ^d
B - Ag.F.Ag. (20)	37,80 ± 2,11	20,95 ± 3,11	16,85 ± 2,95 ^d	10,70 ± 0,75	6,55 ± 1,09	4,15 ± 0,91 ^d
A x B ^c	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

a - Os grupos estão descritos em Material e Métodos (entre parêntesis, o número de ratos)

b - Os resultados estão expressos em média ± erro padrão

c - Teste "t" para amostras independentes entre tratamentos: n.s.

d - Teste "t" para amostras dependentes em cada tratamento: significante para p < 0,001

e - Teste "t" para amostras dependentes em cada tratamento: significante para p < 0,005

2.6. Efeitos da Administração Subcutânea de α -Metilfenilalanina 1,43 g% em Salina e Intraperitoneal de Fenilalanina 3,6 g% em Salina Antes do Treino no Comportamento de Ratos em Campo Aberto

A administração aguda de fenilalanina 4 g% em salina intraperitonealmente provoca aumento nos níveis séricos e cerebrais de fenilalanina e também de tirosina, pois a enzima fenilalanina hidroxilase do fígado do rato está ativa. Por este aumento de tirosina não ser verificado no paciente fenilcetonúrico, foi utilizado um agente químico inibidor da fenilalanina hidroxilase hepática, a α -metilfenilalanina. Isto possibilitou melhor adequação do modelo animal à doença humana. Entretanto, a inibição da fenilalanina hidroxilase não é total (GREENGARD et alii, 1976), o que permite alguma elevação da tirosina quando há suplementação com fenilalanina.

O estudo com α -metilfenilalanina foi realizado com sobrecarga de fenilalanina apenas antes do treino, uma vez que as experiências anteriores haviam indicado que a hiperfenilalaninemia afeta apenas a fase de aquisição e/ou consolidação na tarefa de campo aberto.

No treino, os grupos controle e experimentais apresentaram o mesmo número de cruzamentos e de "rearings". Isto sugere que o uso de α -metilfenilalanina associada à fenilalanina 3,6 g% em salina ou apenas à salina não interfere na atividade motora nem no comportamento exploratório dos animais.

A diferença treino-teste tanto em número de cruzamentos quanto em número de "rearings" foi significativa apenas no grupo controle e, portanto, somente este grupo evidenciou memó-

ria (Tabela VII).

ANDERSON & GUROFF (1972) verificaram que ratos machos "Pregnat F 344" com hiperfenilalaninemia crônica ou mesmo do grupo salina eram menos ativos do que as fêmeas, em campo aberto.

Contudo, não foi encontrada diferença significativa no número de cruzamentos no treino em campo aberto entre ratos Wistar machos e fêmeas, tanto nos grupos com administração intraperitoneal de solução salina ou fenilalanina antes do treino. Isto indica que não há diferença na atividade motora em campo aberto entre ratos Wistar machos e fêmeas, com 29 e 31 dias de idade.

2.7. Efeitos da Administração Intraperitoneal de β -bloqueador (Propranolol) e de Fenilalanina 4 g% em Salina Antes do Treino no Comportamento de Ratos em Campo Aberto

As experiências anteriores evidenciaram uma relação entre hiperfenilalaninemia e alteração na fase de aquisição e/ou consolidação da tarefa de ratos submetidos ao teste de campo aberto. Como a fenilalanina e a tirosina são precursores de neurotransmissores adrenérgicos, foi usado o propranolol, um β -bloqueador dos receptores β_1 e β_2 adrenérgicos com a finalidade de verificar se os efeitos da hiperfenilalaninemia eram ou não mediados por aqueles neurotransmissores.

Os resultados mostram que o bloqueio dos β -receptores adrenérgicos não interfere com o efeito da hiperfenilalaninemia na aquisição e/ou consolidação da tarefa (Tabela VIII).

TABELA VII. Desempenho em campo aberto de ratos tratados com administração subcutânea prévia de 3,0 ml . 100 g⁻¹ de peso corporal de solução salina 0,85% ou de α -metil-fenilalanina 1,43 g% e intraperitoneal de 2,5 ml . 100 g⁻¹ de peso corporal de solução salina 0,85 g% ou de solução de fenilalanina 3,6 g% em salina antes do treino.

TRATAMENTO ^a	CRUZAMENTOS ^b			"REARINGS" ^b		
	Treino	Teste	Δ (Treino-Teste)	Treino	Teste	Δ (Treino-Teste)
A - SAL-SAL (28)	43,89 ± 1,19	36,18 ± 2,09	7,71 ± 1,63 ^c	10,25 ± 0,46	7,21 ± 0,69	3,04 ± 0,61 ^c
B - α -SAL (28)	41,36 ± 1,70	40,89 ± 2,37	0,47 ± 2,06	9,39 ± 0,47	7,93 ± 0,61	1,46 ± 0,72
C - α -FEN (22)	41,32 ± 1,04	44,18 ± 1,67	-2,64 ± 1,37	9,95 ± 0,37	9,77 ± 0,56	0,18 ± 0,72
Teste de DUNCAN ^d :	n.s.	A < C	A > C	n.s.	A < C	A > C

a - Os grupos estão descritos em Materiais e Métodos (entre parêntesis, o número de ratos).

b - Os resultados estão expressos em média ± erro padrão.

c - Teste "t" para amostras dependentes em cada tratamento: significante para $p < 0.001$.

d - Teste DUNCAN entre os grupos: significante a nível de 5%.

TABELA VIII. Desempenho em campo aberto de ratos tratados com administração de salina 0,85 g% ou de propranolol associado à solução salina ou à fenilalanina 4 g% em salina na dose de 2.5 ml . 100 g⁻¹ de peso corporal.

TRATAMENTOS ^a	CRUZAMENTOS ^b			"REARINGS" ^b		
	Treino	Teste	Δ (Treino-Teste)	Treino	Teste	Δ (Treino-Teste)
A - SAL-SAL (16)	42,94 ± 7,11	33,87 ± 12,82	8,56 ± 12,80 ^c	8,50 ± 2,22	5,31 ± 2,75	3,19 ± 3,60 ^d
B - β-SAL (15)	45,40 ± 5,70	34,53 ± 12,88	10,20 ± 15,00 ^c	10,20 ± 3,76	6,00 ± 3,58	4,20 ± 3,55 ^e
C - β-Phe (17)	40,41 ± 9,03	44,94 ± 14,40	-4,53 ± 13,48	9,00 ± 2,50	10,47 ± 2,67	-1,47 ± 3,00
Teste de DUNCAN ^f	n.s.	n.s.	C < A e B	n.s.	C > A e B	C < A e B

a - Os grupos estão descritos em Materiais e Métodos (entre parêntesis, o número de animais).

b - Os resultados estão expressos em média ± erro padrão.

c - Teste "t" para amostras dependentes em cada tratamento: significativa para p < 0,05.

d - Teste "t" para amostras dependentes em cada tratamento: significativa para p < 0,005.

e - Teste "t" para amostras dependentes em cada tratamento: significativa para p < 0,001

f - Teste DUNCAN entre os grupos: significativa a nível de 5%.

DISCUSSÃO

Para o estudo de fenilcetonúria têm sido utilizados, principalmente, modelos experimentais de hiperfenilalaninemia crônica, induzida em animais por vários métodos, com grande variabilidade na idade em que começa e finda o tratamento. Os dados obtidos através destes modelos têm contribuído apenas parcialmente para o entendimento dos mecanismos patogênicos da doença devido ao mascaramento das alterações primárias pelas secundárias subsequentes.

Os modelos de hiperfenilalaninemia aguda permitem estudar as alterações imediatas provocadas por elevados níveis séricos e cerebrais de fenilalanina.

Embora os mecanismos sejam obscuros, vários trabalhos demonstram que o aumento de fenilalanina no cérebro durante o período vulnerável de desenvolvimento cerebral causa alterações morfo-funcionais (BICKEL et alii, 1954; AGRAWAL & DAVISON, 1973 - citado por TOURIAN & SIDBURY, 1983).

Persistem controvérsias a respeito de possíveis efeitos de elevadas concentrações de fenilalanina sobre as funções cerebrais quando o desenvolvimento do cérebro está quase completo. É desconhecido se hiperfenilalaninemia perturba as funções do Sistema Nervoso Central nessas condições. Entretanto,

KRAUSE et alii (1985) verificaram que elevadas concentrações plasmáticas de fenilalanina comprometem o desempenho de pacientes fenilcetonúricos tratados, em testes neuropsicológicos de alta função integrativa.

Assim, o estudo em animais adultos jovens pode contribuir acrescentando informações a respeito do efeito de hiperfenilalaninemia sobre cérebro em fase final de desenvolvimento.

O desenvolvimento das estruturas cerebrais durante o crescimento dos animais é acompanhado pela evolução no comportamento e capacidade para aprender e memorizar tarefas.

Ratos jovens de até 28 dias de idade não apresentam o sistema hipocampal completamente desenvolvido (IZQUIERDO et alii, 1975) sendo esta estrutura essencial aos processos de aprendizagem de tarefas; com idade inferior a 20-21 dias, os ratos apresentam imaturidade nos sistemas catecolaminérgicos (KELLER et alii, 1973 - citado por SOUZA, 1980), que parecem ser essenciais, por exemplo, no fator associação entre campainha e choque elétrico para o aprendizado da resposta condicionada em esquiwa ativa de 2 vias.

Aos 30 dias de idade a mielinização do Sistema Nervoso Central é similar à do rato adulto (WIGGINS, 1982). Portanto, a vulnerabilidade do cérebro de ratos com 30 dias pode ser comparável à de adultos quanto a este aspecto.

Através destas considerações, no presente trabalho a idade dos animais variou de 29 a 31 dias.

A administração aguda de fenilalanina, além de elevar os níveis cerebrais de fenilalanina e tirosina (Figura 6), causa redução no conteúdo cerebral de treonina, valina, metionina,

isoleucina, histidina e triptofânio (Mc KEAN et alii, 1968).

Tem sido proposto que a diminuição destes aminoácidos no cérebro seja causada por dois efeitos da hiperfenilalaninemia: inibição da captação cerebral dos aminoácidos (GUROFF & UDENFRIEND, 1962; LINDROOS & OJA, 1971; OLDENDORF, 1973) e facilitação do efluxo dos mesmos pelas células cerebrais (HUGHES & JOHNSON, 1976).

O desequilíbrio de aminoácidos no cérebro tem sido relacionado com o comprometimento das capacidades mentais dos pacientes fenilcetonúricos por causar deficiência dos precursores de aminas biogênicas: tirosina, triptofânio e 5 hidroxitriptofânio (BUTIER et alii, 1981; KRAUSE et alii, 1985) e/ou por inibir a síntese de proteínas cerebrais (AOKI & SIEGEL, 1970; LINDROOS & OJA, 1971), principalmente as proteínas da mielina (AGRAWAL et alii, 1970).

Entretanto, a inibição de síntese protéica cerebral tem sido demonstrada, principalmente, em animais jovens, sendo os adultos mais resistentes aos mecanismos de inibição da síntese de proteínas no cérebro (AOKI & SIEGEL, 1971; BERGER et alii, 1978, 1979 - citados por BERGER et alii, 1980).

Considerando que neste trabalho os animais utilizados são adultos, provavelmente não há inibição de síntese protéica cerebral nos mesmos.

O modelo de hiperfenilalaninemia aguda provocada com sobrecarga de fenilalanina causa elevação deste aminoácido no soro e cérebro dos animais, reproduzindo a alteração no metabolismo da fenilalanina observada em pacientes fenilcetonúricos (TOURIAN & SIDBURY, 1983). Entretanto, a característica ausên

cia da atividade da enzima fenilalanina hidroxilase e as concentrações séricas e cerebrais normais ou diminuídas de tirosina não são reproduzidas. Há elevação nos níveis deste aminoácido, pois no animais a enzima fenilalanina hidroxilase está ativa.

A inibição da enzima fenilalanina hidroxilase tem sido induzida pelo uso de p-clorofenilalanina ou α -metilfenilalanina.

Há trabalhos que indicam ser a α -metilfenilalanina o melhor supressor da atividade daquela enzima, não apresentando efeitos colaterais como inibição da triptofânio hidroxilase (GREENGARD et alii, 1976), nem tóxicos, como alta mortalidade e desenvolvimento de cataratas (LANE et alii, 1980), observados com o uso de p-clorofenilalanina (GREENGARD et alii, 1976; DEL VALLE et alii, 1978; LANE et alii, 1980).

A administração de α -metilfenilalanina não altera os níveis plasmáticos de tirosina (Tabela 1), nem de vários outros aminoácidos, como treonina, glutamina, prolina, glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina e ácido glutâmico (GREENGARD et alii, 1976).

A influência da p-clorofenilalanina no ganho de peso dos animais tem sido demonstrada por vários investigadores, enquanto os resultados com o uso da α -metilfenilalanina sobre o crescimento dos animais são controvertidos. Alguns investigadores (GREENGARD et alii, 1976; DEL VALLE et alii, 1978; GREENGARD et alii, 1979 - citado por GLICK & GREENGARD, 1980) não encontraram diferenças no desenvolvimento em relação aos controles, mas LUTTGES & GERREN (1979) verificaram que a utilização de α -metilfenilalanina com suplementação de fenilalanina preco-

amente em ratos leva a um menor ganho de peso durante o tratamento.

Foi demonstrado que a α -metilfenilalanina inibe apenas parcialmente a atividade da enzima fenilalanina hidroxilase hepática, sem afetar a enzima renal (DEL VALLE et alii, 1978).

A inibição pela α -metilfenilalanina, com ou sem suplementação de fenilalanina, é um processo vagaroso e irreversível. A atividade enzimática mínima é atingida em 20 horas e, somente após um intervalo de 48 horas, requeridos para a ressíntese da enzima, a atividade da fenilalanina hidroxilase hepática retorna ao normal (DEL VALLE et alii, 1978).

GREENGARD et alii (1976), trabalhando com ratos de 6 dias de idade encontraram inibição de 75% na atividade da fenilalanina hidroxilase após 20 horas de administração do inibidor. Entretanto, deve ser considerado que nesta idade o conteúdo de fenilalanina hidroxilase no fígado é cerca de 60% do encontrado em adultos e que em ratos com 30 dias de idade a atividade desta enzima está próxima dos níveis adultos (FREEDLAND et alii, 1962). DEL VALLE et alii (1978) verificaram que a atividade da fenilalanina hidroxilase em ratos de 22 dias de idade, 24 horas após a administração subcutânea de α -metilfenilalanina, foi reduzida em aproximadamente 58%.

Vários tipos de tarefas têm sido utilizadas na análise comportamental de animais hiperfenilalaninêmicos.

No presente trabalho, em esquivas ativas de 2 vias, tanto os ratos do grupo controle quanto os do grupo hiperfenilalaninêmico apresentaram diferença significativa de desempenho no teste em relação ao treino. Entretanto, o aumento da atividade

motora no teste, da mesma ordem que a resposta associativa, não permite afirmar que houve aprendizado da tarefa. Assim, embora a administração de fenilalanina tenha ocasionado menor desempenho dos ratos no treino e no teste, em relação ao grupo controle, a redução concomitante da atividade motora poderia justificar o menor desempenho. Os dados obtidos não permitem assegurar que altas concentrações séricas e cerebrais de fenilalanina afetam alguma fase da cadeia de eventos que leva da aquisição à evocação e não apenas por influenciar na atividade motora dos a n i m a i s.

A esQUIVA inibitória não fornece medida de aquisição (DAVIS & SQUIRE, 1984), mas sim medida de memória, indicando a l t e r a ç ã o no processo de memorização quando o desempenho dos animais experimentais é inferior ao dos controles.

Os resultados obtidos em esQUIVA inibitória demonstram que a memória não é afetada pela hiperfenilalaninemia, uma vez que elevadas concentrações de fenilalanina durante o período do treino, pós-treino ou no teste não interferiram com o desempenho dos animais nesta tarefa.

Os resultados em campo aberto, obtidos neste trabalho, demonstram não haver diferenças significativas entre grupos con t ro l e hiperfenilalaninêmicos no número de cruzamentos e de "rearings", no treino. Isto indica que hiperfenilalaninemia i n d u z i d a com sobrecarga de fenilalanina, com ou sem o uso de α -m e t i l f e n i l f e n i l a n i n a, em ratos de 29 a 31 dias de idade, não i n t e r f e r e na atividade motora e no comportamento exploratório dos animais (Tabelas V, VI, VII).

A administração de fenilalanina pós-treino ou pré-tes-

te não influencia o desempenho dos animais em campo aberto, os quais evidenciaram memória (diferenças entre treino e teste em número de cruzamentos e de "rearings" significativas) (Tabelas V, VI).

Por outro lado, altas concentrações de fenilalanina no momento do treino impedem diferenças significantes no número de cruzamentos e de "rearings" entre treino e teste (Tabela V). Estes resultados fortemente sugerem a existência de uma relação entre hiperfenilalaninemia aguda e alteração na fase de aquisição e/ou de consolidação sem afetar a evocação da memória nesta tarefa.

Os dados de atividade motora de animais hiperfenilalaninêmicos em campo aberto têm sido variados. SNODGRASS (1974) encontrou decréscimo na atividade motora de ratos com administração aguda de fenilalanina. GIBSON et alii (1982) verificaram que a atividade motora em camundongos não é alterada pela hiperfenilalaninemia. Suplementação de fenilalanina na dieta tem sido associada com aumento na atividade motora de camundongos (THURMOND et alii, 1980), sem afetá-la em ratos (GREEN et alii, 1962).

Os estudos em modelos crônicos, em sua maioria, provocam hiperfenilalaninemia precocemente nos animais e após um intervalo variável de tempo, os testam em várias tarefas. Isto porque vários estudos demonstraram que deficiências de aprendizado evidentes durante o tratamento foram freqüentemente revertidas quando o tratamento cessava (POLIDORA et alii, 1966; AIRAKISEN et alii, 1975; SCHALOCK et alii, 1975).

Tem sido demonstrado que animais fenilcetonúricos apre

sentam igual desempenho que os controles em esquiva ativa (ANDERSEN & GUROFF, 1972; ANDERSEN et alii, 1973 - citado por STRUPP et alii, 1982; ANDERSEN et alii, 1974; SCHALOCK et alii, 1975; LUTTGES & GERREN, 1979) e muitas outras tarefas, principalmente do tipo essencial (STRUPP et alii, 1982).

ANDERSEN & GUROFF (1972) e ANDERSEN et alii (1974) verificaram que ratos hiperfenilalaninêmicos desempenham da mesma maneira que os controles em esquiva ativa, mas com menor desempenho em esquiva inibitória e hiperatividade em campo aberto. FULTON et alii (1980) encontraram deficiência de aprendizado em esquiva ativa de seus animais "fenilcetonúricos", os quais se apresentavam hipoativos. LUTTGES & GERREN (1979) demonstraram que hiperfenilalaninemia crônica induzida pelo uso de α -metilfenilalanina com suplementação com fenilalanina somente em período pós-natal precoce, e não após, produz deficiência no desempenho em esquiva inibitória. E também, no mesmo trabalho, os animais se apresentavam hiperativos em relação ao grupo com hiperfenilalaninemia induzida mais tardiamente.

STRUPP et alii (1984) sugeriram que as alterações na atividade motora, mais do que qualquer influência direta da hiperfenilalaninemia sobre a capacidade dos animais em aprender e memorizar, seja responsável pelo desempenho nos testes de esquiva ativa e inibitória, uma vez que a hiperatividade facilita o desempenho em esquiva ativa e interfere no de esquiva inibitória.

A alteração secundária à hiperfenilalaninemia aguda induzida sem o uso do inibidor é a elevação dos níveis de tirosina. Ao contrário, em pacientes fenilcetonúricos, os níveis de

tirosina se encontram normais ou diminuídos, com concentrações subnormais de catecolaminas (Mc KEAN, 1972). Entretanto, apesar da fenilalanina ser o aminoácido precursor de tirosina e, portanto, sua administração elevar os níveis séricos e cerebrais de tirosina (Figura 6; Tabela I), os níveis de catecolaminas são encontrados decrescidos (GIBSON et alii, 1982) ou normais (BRASS & GREENGARD, 1982) em animais hiperfenilalaninêmicos.

Isto pode ser explicado, em parte, pelo efeito inibitório exercido pela fenilalanina sobre a enzima tirosina hidroxilase (IKEDA et alii, 1967). Outro fator a ser considerado corresponde aos mecanismos de regulação da síntese de catecolaminas. Estudos em seres humanos mostram que um aumento nas concentrações séricas e cerebrais de tirosina por ingestão deste aminoácido produz aumento de catecolaminas apenas transitório (RASMUSSEN et alii, 1983). Em camundongos, a administração de tirosina não produz aumento significativo nos níveis de dopamina e noradrenalina no cérebro destes animais (GIBSON et alii, 1982).

Embora a enzima tirosina hidroxilase não seja saturada com seu substrato (CARLSSON & LINDQVIST, 1978 - citado por WURTMAN et alii, 1980) nem significativamente inibida por seu produto final (WURTMAN et alii, 1980), o aumento de tirosina sérica e cerebral aparentemente não causa elevação dos níveis de dopamina e noradrenalina (WURTMAN et alii, 1980; KANEYUKI et alii 1984).

A síntese e liberação de catecolaminas também são moduladas por mecanismos de "feedback" extracelulares envolvendo auto-receptores pré-sinápticos ou dendríticos e mudanças na velocidade de ativação neuronal (FARNEBO & HAMBERGER, 1971; NOWYCHY & ROTH, 1978 - citados por WURTMAN, 1980).

Neurônios catecolaminérgicos cerebrais e periféricos respondem ou não a alterações na disponibilidade de tirosina dependendo do estado fisiológico (WURTMAN, 1983). Quando os neurônios estão ativados, a enzima limitante da velocidade de síntese de catecolaminas (WEINER, 1975; LEVITT et alii, 1965 - citados por MASSERANO & WEINER, 1983), a tirosina hidroxilase, torna-se fosforilada, completamente saturada com o cofator e dependente do substrato, o aminoácido tirosina (LEVINE et alii, 1981; SCALLY et alii, 1977 - citados por WURTMAN, 1983). Quando estão lentos, ela é desfosforilada perdendo a dependência de tirosina (WURTMAN, 1983).

Tem sido demonstrado que situações estressantes estimulam os neurônios catecolaminérgicos (GRAHAM-JONES, 1983; TURNBULL, 1983; REINSTEIN et alii, 1984) e ativam a enzima tirosina hidroxilase, que se torna fosforilada (MASSERANO & WEINER, 1983; FLUHARTY et alii, 1985).

Em animais normais, o estresse provocado por choque elétrico inescapável, causa depressão nos níveis de noradrenalina em algumas regiões cerebrais como hipotálamo e tronco cerebral (incluindo locus ceruleus) (STONE, 1975; ANISMAN, 1978; WEISS et alii, 1980; NAKAGAWA et alii, 1981; ROTH et alii, 1982 - citados por REINSTEIN et alii, 1984), decréscimo na atividade motora, no comportamento exploratório e deficiência em resposta de esquiva (ANISMAN et alii, 1980 - citados por REINSTEIN et alii, 1984). Portanto, quando os animais recebem tratamento prévio que ativa os neurônios catecolaminérgicos, como o choque elétrico, a administração de tirosina, aumentando sua disponibilidade, permite maior síntese e liberação destes neurotransmis-

sores, provavelmente pela ativação da tirosina hidroxilase, protegendo os animais das alterações neuroquímicas e comportamentais observadas em animais normais, quando intensamente estressados (REINSTEIN et alii, 1984).

Desta forma, em esquivas ativas de 2 vias, por ser um teste aversivo e estressante, os animais controles poderiam apresentar níveis decrescidos de noradrenalina e redução da atividade motora em relação a animais não submetidos a esta tarefa. Durante o teste, os animais, por escaparem mais do choque, menos estressados, apresentam atividade motora mais intensa.

Por outro lado, os níveis cerebrais de tirosina em ratos que receberam sobrecarga de fenilalanina estão elevados, e possivelmente, os níveis de noradrenalina não decrescem.

A atividade motora dos animais hiperfenilalaninêmicos deveria, então, ser maior do que a do grupo controle, o contrário do que foi observado.

A hidroxilação de tirosina a DOPA é acelerada pela administração de tirosina no cérebro de ratos que receberam drogas que bloqueiam a conversão de DOPA a catecolaminas. Esta resposta não implica necessariamente que administração de tirosina acelere a síntese de DOPA quando sua conversão a catecolaminas não está bloqueada (WURTMAN et alii, 1980).

No presente trabalho, a administração de propranolol, uma droga bloqueadora dos receptores β -adrenérgicos, não modificou os efeitos da hiperfenilalaninemia. Os resultados indicam que o teste em campo aberto não é dependente do funcionamento daqueles receptores.

Portanto, uma vez que níveis aumentados ou decrescidos

de tirosina, com ou sem bloqueio de receptores, resultam em deficiência na aquisição e/ou consolidação da tarefa em campo aberto por ratos hiperfenilalaninêmicos, os resultados sugerem que as alterações nos níveis de tirosina não influem no comprometimento observado nesta tarefa.

Muitos investigadores têm encontrado níveis decrescidos de serotonina no plasma de pacientes fenilcetonúricos (DAVISON & SANDLER, 1958; Mc KEAN et alii, 1967); (HUANG & HSIA, 1963 - citados por PIEL et alii, 1982; PARE et alii, 1975) e no plasma e cérebro de animais hiperfenilalaninêmicos (YUWILER & LOUTTIT, 1961; Mc KEAN et alii, 1962; HSIA et alii, 1963; WOOLLEY & van der HOEVEN, 1964; KOHSAKA & TSUKADA, 1979), sendo esta alteração assumida como um dos fatores envolvidos no retardo mental de pessoas fenilcetonúricas (HSIA et alii, 1963; WOOLLEY & van der HOEVEN, 1964).

Neste trabalho, a administração de fenilalanina, com ou sem prévio tratamento com α -metilfenilalanina, não causou um decréscimo significativo nos níveis de triptofânio em relação ao grupo controle (Tabela I), sugerindo que os níveis cerebrais de serotonina estão normais. Portanto, a deficiência observada na tarefa em campo aberto nos animais hiperfenilalaninêmicos parece ser independente de alterações nos níveis de serotonina.

WOOLLEY & van der HOEVEN (1964) sugerem que o defeito mental encontrado em fenilcetonúria experimental em camundongos está relacionada com baixos níveis de serotonina na vida precoce do animal. Eles observaram que o efeito sobre o aprendizado em labirinto-T pode ser evitado quando estes animais recebem administração de 5-hidroxitriptofânio ou melatonina. Estes auto-

res sugerem que a deficiência mental característica da fenilcetonúria humana deve resultar de depleção nos níveis de serotonina cerebral durante período da infância. Mc KEAN et alii (1967) também observaram desempenho prejudicado em tarefas, bem como níveis decrescidos de serotonina em animais hiperfenilalaninêmicos.

Foi demonstrado que excesso de fenilalanina na dieta causa queda na concentração de serotonina cerebral em ratos (BOGGS et alii, 1963), camundongos (WOOLLEY & van der HOEVEN, 1963) e cobaias (HSIA et alii, 1963). LANE et alii (1980) demonstraram que hiperfenilalaninemia crônica leva a um decréscimo nos níveis cerebrais de serotonina em ratos com 30 dias de idade.

PARE et alii (1957) foram os primeiros a sugerir que a deficiência de produção de serotonina deve assumir alguma função na patogênese do defeito mental em fenilcetonúria.

O mecanismo para o decréscimo de serotonina no cérebro tem sido estudado por vários investigadores. Acredita-se que o decréscimo nas concentrações de triptofânio (FERNSTROM & WURTMAN, 1971; SMITH et alii, 1977 - citados por LANE et alii, 1980) e na atividade da triptofânio hidroxilase no cérebro cause a depleção de serotonina naquele órgão (YUWILER et alii, 1965); (KOHSAKA et alii, 1975 - citado por KOHSAKA & TSUKADA, 1979). Vários efeitos da hiperfenilalaninemia sobre o metabolismo da serotonina são sugeridos: inibição do transporte de triptofânio ou de 5-hidroxitriptofânio (Mc KEAN et alii, 1962; PIEL et alii, 1982) através da barreira cérebro-sangue ou das membranas das células cerebrais, diminuindo a disponibilidade deste aminoácido para a hidroxilação; inibição da enzima triptofânio hidroxil

lase (GRAHAME-SMITH & MOLONEY, 1965 - citado por KRAUSE et alii, 1985); inibição da 5-hidroxitriptofânio descarboxilase por fenilacetato, um metabólito da fenilalanina (DAVISON & SANDLER, 1958). Além disso, altas concentrações de fenilalanina inibem a recaptação de 5-hidroxitriptofânio pelas células endoteliais do plexo coróide e aumentam seu efluxo destas células, levando a um acúmulo de 5-hidroxitriptofânio no líquido céfalo-raquidiano (PIEL et alii, 1982).

Por outro lado, PERRY et alii (1965) verificaram que baixas concentrações cerebrais de serotonina em ratos jovens com hiperfenilalaninemia no período neonatal (apenas até 8 dias de idade) não foram seguidos por comprometimento na capacidade de aprendizagem.

KOHSAKA & TSUKADA (1979) também sugerem que não há correlação entre o decréscimo de serotonina cerebral e o comprometimento na capacidade de aprender, uma vez que os animais com hiperfenilalaninemia crônica induzida após o desmame e testados em discriminação operante de luminosidade algum tempo após o término do tratamento, apresentaram níveis normais de serotonina e dificuldade em aprender a tarefa.

LOO et alii (1980) sugerem que alterações nos níveis de serotonina aparentemente não levam a um comprometimento no comportamento de animais hiperfenilalaninêmicos. Similarmente, os níveis decrescidos de catecolaminas encontrados em pacientes fenilcetonúricos (Mc KEAN, 1972) não são apontados por LOO et alii (1980) como responsáveis pelo retardo mental em fenilcetonúria, uma vez que a captação de catecolaminas em preparações sinaptosomais de cérebro de animais foi igual para o grupo de

ratos com comportamento normal ou comprometido.

Através de todas as considerações a respeito dos níveis de catecolaminas e serotonina no cérebro dos animais hiperfenilalaninêmicos, pode-se concluir que a deficiência na aquisição e/ou consolidação da tarefa em campo aberto provavelmente decorre da hiperfenilalaninemia aguda e não de alterações secundárias nos neurotransmissores.

Em campo aberto, 21 horas após a administração subcutânea de α -metilfenilalanina, os animais efetuaram número de cruzamentos e de "rearings" iguais aos do controle, demonstrando não haver interferência da droga na atividade motora nem no comportamento exploratório dos animais. Entretanto a diferença no número de cruzamentos e de "rearings" entre o treino e o teste não foi significativa, sugerindo que a α -metilfenilalanina afeta os processos de aprendizado e memória. Foi observado que após 10-14 horas da administração oral de α -metilfenilalanina, as respostas de esquiva de cães e macacos "esquilo" se encontram diminuídas (TORCHIANA et alii, 1970). A administração aguda de α -metilfenilalanina e fenilalanina imediatamente pré-teste não interferiu no desempenho de ratos adultos em labirinto Y de discriminação com alimentos para a medida de aquisição e retenção (LANE et alii, 1980).

A administração somente de α -metilfenilalanina causa decréscimo significativo nos níveis cerebrais de tirosina e elevação nas concentrações de triptofânio no momento do treino em campo aberto (Tabela I).

TORCHIANA et alii (1970) encontraram depleção de catecolaminas periféricas em camundongos após administração aguda de α -metilfenilalanina. Entretanto, não foi detectada altera-

ção nos níveis cerebrais de dopamina e noradrenalina após 16 horas da administração do análogo da fenilalanina.

O metaraminol é um metabólito de α -metilfenilalanina e foi identificado em cérebro, supra-renal e coração de camundongos, ratos e cães (TORCHIANA et alii, 1970). O tempo relativamente longo em que há depleção nos níveis de catecolaminas cerebrais, até 16 horas após o uso de α -metilfenilalanina, pode ser melhor atribuído ao seu metabólito metaraminol, o qual é um potente depressor de noradrenalina (GESSA et alii, 1962; SHORE et alii, 1964 - citados por TORCHIANA et alii, 1970), do que a rápida e reversível inibição da enzima tirosina hidroxilase. Já, a depleção nos níveis de catecolaminas, observada apenas em ratos muito jovens, é restaurada em poucas horas (BRASS & GREENGARD, 1982).

A administração aguda de α -metilfenilalanina não causa alteração nos níveis cerebrais de serotonina em ratos jovens (GREENGARD et alii, 1976). E, como foi mencionado, manipulação nos níveis dos precursores não necessariamente se traduz em alterações nos níveis dos neurotransmissores. Por isto, os aumentados níveis de triptofânio no cérebro dos animais que receberam somente α -metilfenilalanina não necessariamente indicam que os níveis de serotonina estão aumentados.

A excreção urinária de α -metilfenilalanina em cães foi medida após administração oral de $30 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal. Cerca de 60 - 70% do aminoácido administrado foi excretado em 24 horas, sendo uma pequena quantidade (0.01 - 0.10 %) excretado como α -metil, m-tirosina (TORCHIANA et alii, 1970).

DEL VALLE et alii (1978) verificaram que a fenilalanina-

na hidroxilase de fígado de rato, em condições ótimas, e na presença de α -metilfenilalanina, não hidroxila quantidades significativas desta análogo de seu substrato natural.

Ratos que recebem α -metilfenilalanina sem suplementação de fenilalanina, em experimento crônico ou agudo não devem ser considerados como controles para os que recebem o inibidor da fenilalanina hidroxilase hepática e sobrecarga de fenilalanina, os quais mimetizam muitas das alterações bioquímicas observadas em pacientes fenilcetonúricos. Aquele grupo deve ser analisado com outro grupo experimental, no qual é possível verificar alguns efeitos da droga ou de seus metabólitos sobre níveis cerebrais de aminoácidos, de neurotransmissores ou outros componentes cerebrais que possam interferir no desempenho dos animais, além de se constituírem num modelo parcial de fenilcetonúria leve.

Hiperfenilalanina crônica induzida em ratos desde o 3º dia de vida com administração diária de fenilalanina e α -metilfenilalanina ou p-clorofenilalanina até 30 dias de idade provoca aumento na atividade cerebral de fosfoserina fosfatase (DEL VALLE et alii, 1978).

Esta enzima cataliza a desfosforilação da serina fosforilada, aumentando o "pool" de serina livre e a via metabólica de síntese do neurotransmissor glicina (FALLON et alii, 1966).

Portanto, o aumento da atividade da fosfoserina-fosfatase cerebral em ratos com hiperfenilalaninemia crônica induzida com α -metilfenilalanina ou p-clorofenilalanina pode ser uma alteração no metabolismo da serina e isto estar relacionado com as alterações no comportamento de ratos hiperfenilalaninêmicos.

Outro fator a ser considerado é a grande produção de metabólitos da fenilalanina: fenilpiruvato, fenilactato, fenilacetato, feniletilamina e o-hidroxifenilacetato por pacientes fenilcetonúricos (JERVIS, 1950; JERVIS, 1952; ARMSTRONG & LOW, 1957) e por animais com hiperfenilalaninemia.

MENKES (1967) sugeriu que os efeitos irreversíveis da fenilcetonúria pudessem ser causados por ação neurotóxica direta destes metabólitos durante o período vulnerável de desenvolvimento cerebral.

Vários trabalhos demonstram que altas concentrações de metabólitos da fenilalanina decrescem os níveis de neurotransmissores e estão associados com alterações funcionais e estruturais do Sistema Nervoso Central (FELLMAN, 1956; DAVISON & SANDLER, 1958; SILBERBERG, 1967; SHAH et alii, 1969; WEBER, 1969); (HANSON, 1958; LASALA & CONSCIA, 1979 - citados por SANDLER, 1982).

Neste estudo não foram determinados os níveis de metabólitos da fenilalanina. Dados anteriores da literatura mostram que, 1 hora após a administração de fenilalanina, com ou sem inibidor da fenilalanina hidroxilase, há elevação nos níveis plasmáticos de fenilalanina os quais atingem valores similares aos encontrados neste trabalho; também há aumento nas concentrações cerebrais de alguns metabólitos, principalmente, de fenilactato. Portanto, é bastante provável que as concentrações cerebrais, pelo menos de fenilactato, estejam elevadas nos animais hiperfenilalaninêmicos utilizados no presente trabalho. Sendo assim, existe a possibilidade de que o efeito comportamental mais marcante encontrado, ou seja, comprometimento na aqui-

sição e/ou consolidação da tarefa em campo aberto por ratos hiperfenilalaninêmicos seja causado por ação neurotóxica deste me tabólito.

CONCLUSÕES

1 - Hiperfenilalaninemia aguda produzida em ratos jovens com 29 - 31 dias de idade, com desenvolvimento do Sistema Nervoso Central similar ao de adultos, não afeta a atividade motora nem o comportamento exploratório dos animais, mas afeta a aquisição e/ou consolidação da memória, sem interferir na evocação da mesma na tarefa do campo aberto. Estes efeitos independem da presença do inibidor da fenilalanina hidroxilase hepática, a α -metilfenilalanina.

2 - A alteração comportamental observada não parece estar relacionada com níveis anormais de triptofânio ou de tirosina.

3 - Administração aguda de α -metilfenilalanina provoca comprometimento no desempenho de ratos em campo aberto.

4 - A hiperfenilalaninemia não interfere no comportamento de ratos em esquiiva inibitória.

5 - O teste em esquiiva ativa não se mostrou apropriado para o estudo comportamental em ratos com 29 - 31 dias de idade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRAKISEN, M.M.; LEPPANEN, M-L.; TURAKKA, H.; MARVOLA, M.; Mac DONALD, E.J. Protective effect of tryptophan and 5-HTP on experimental phenylketonuria induced with phenylalanine and p-chlorophenylalanine in rats. *Med. Biol.*, 53:481-8, 1975.
- AGHARANYA, J.; ALONSO, R.; WURTMAN, R.J. Changes in catecholamine excretion following tyrosine ingestion in normally fed human subjects. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 34: 82-7, 1981.
- AGRAWAL, H.C.; BONE, A.H.; DAVISON, A.N. Effect of phenylalanine on protein synthesis in the developing rat brain. *Biochem. J.*, 117: 325-31, 1970.
- ALEJANDRE, M.J.; MARCO, C.; RAMIREZ, H.; SEGOVIA, J.L.; GARCIA-PEREGRIN, E. Lipid composition of brain myelin from normal and hyperphenylalaninemic chick embryos. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77B: 329-32, 1984.
- ALVORD, E.C.; STEVENSON, L.D.; VOGEL, F.S. et alii. Neuropathological findings in phenylpyruvic oligophrenia (phenylketonuria). *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 9: 298-310, 1950.
- AMBRUS, C.M.; AMBRUS, J.L.; HORVAT, C.; PEDERSEN, H.; SHARMA, S.; KANT, C.; MIRAND, E.; GUTHRIE, R.; PAUL, T. Phenylalanine depletion for the management of phenylketonuria: Use of enzyme reactors with immobilized enzymes. *Science*, 201: 837-9, 1978.
- ANDERSEN, A.E. & GUROFF, G. Enduring behavioral changes in rats with experimental phenylketonuria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 863-7, 1972.
- ANDERSEN, A.E.; ROWE, V.; GUROFF, G. The enduring behavioral changes in rats with experimental phenylketonuria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 71: 21-3, 1974.

- AOKI, K. & SIEGEL, F.L. Hyperphenylalaninaemia: Disaggregation brain polyribosomes in young rats. *Science*, 168: 129-30. 1970.
- APPEL, S.H. Inhibition of brain protein synthesis; an approach to the biochemical basis of neurological dysfunction in the amino-acidurias. *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, 29: 63-70, 1966.
- ARMSTRONG, M.D.; SHAW, K.N.F.; ROBINSON, K.K. Studies on phenylketonuria; excretion of o-hydroxyphenylacetic acid in phenylketonuria. *J. Biol. Chem.*, 213: 797-804, 1955.
- ARMSTRONG, M.D. & LOW, N.L. Phenylketonuria VIII. Relation between age, serum phenylalanine level, and phenylpyruvic acid excretion. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 94: 142-6, 1957.
- AUERBACH, V.H.; WAISMAN, H.A.; WYCKOFF, B.L. Jr. Phenylketonuria in the rat associated with decreased temporal discrimination learning. *Nature*, 182: 871-2, 1958.
- AYLING, J.E.; PIRSON, W.D.; AL-JANABI, J.M.; HELFAND, G.D. Kidney phenylalanine hydroxylase from man and rat. Comparison with the liver enzyme. *Biochemistry*, 13: 78-85, 1974.
- BANOS, G.; DANIEL, P.M.; PRATT, O.E. Saturation of a shared mechanism which transport L-arginine and L-lysine into brain of the living rat. *J. Physiol.*, 236: 29-41, 1974.
- BATSHAW, W.M.L.; VALLE, D.; BESSMAN, S.P. Unsuccessful treatment of phenylketonuria with tyrosine. *J. Pediatr.*, 99 (1): 159-60, 1981.
- BAUMAN, M.M. & KEMPER, T.L. Morphologic and histoanatomic observations of the brain in untreated human phenylketonuria. *Acta Neuropathol.*, 58: 55-63, 1982.
- BAUMANN, N.; LACHAPELLE, F.; TURPIN, J.-C. Mutations in mice affecting brain development and their correlations with human diseases. In: COCKBURN, F. & GITZELMANN, R. *Inborn Errors of Metabolism in Humans*. Lancaster, England. MTP Press Limited International Medical Publishers, 1982, pp. 161-72.
- BENEDICT, C.R.; ANDERSON, G.H.; SOLE, M.J. The influence of oral tyrosine and tryptophan feeding on plasma catecholamines in man. *Am. J. Clin. Nutr.*, 38: 429-35, 1983.
- BERGER, R.; SPRINGER, J.; HOMMES, F.A. Brain protein and myelin metabolism in hyperphenylalaninaemic rats. *Cell. Mol. Biol.*, 26: 31-6, 1980.
- BICKEL, H.; GERRAD, J.; HICKMANS, E.M. The influence of phenylalanine intake on the chemistry and behavior of a phenylketonuric child. *Acta Paediatr. Scand.*, 43: 64-77, 1954.

- BICKIS, I.J.; KENNEDY, J.P.; QUASTEL, J.H. Phenylalanine inhibition tyrosine metabolism in the liver. *Nature*, 179: 1124-6, 1957.
- BINEK-SINGER, P. & JOHNSON, T.C. The effects of chronic hyperphenylalaninemia on mouse brain protein synthesis can be prevented by others amino acids. *Biochem. J.*, 206: 407-14, 1982.
- BLISS, C.I. *Statistics in Biology and Medicine*. New York. Mc Graw Hill, 1967.
- BRAND, K. Metabolism of 2-oxoacid analogs of leucine, valine and phenylalanine by heart, muscle, brain and kidney of the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 677: 126-32, 1981.
- BRASS, C. & GREENGARD, O. Modulation of cerebral catecholamine concentrations during hyperphenylalaninaemia. *Biochem. J.*, 208: 765-71, 1982.
- BRENNEMAN, A.R. & KAUFMAN, S. Phenylalanine hydroxylase in newborn rats. *J. Biol. Chem.*, 240: 3617-22, 1965.
- BOGGS, D.E. & WAISMAN, H.A. Biochemical correlates in rats with phenylketonuria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 106: 307-11, 1964.
- BUTIER, I.J.; O'FLYNN, M.E.; SEIFERT, W.E.; HOWELL, R. Neurotransmitter defects and treatment of disorders of hyperphenylalaninaemia. *J. Pediatr.*, 98: 729-33, 1981.
- CHOO, K.H.; COTTON, R.H.; DANKS, D.M.; JENNINGS, I. Genetics of the mammalian phenylalanine hydroxylase system. *Biochem. J.*, 181: 285-94, 1979.
- CONN, A.R. & STEELE, R.D. Transport of α -keto analogues of amino acids across blood-brain barrier in rats. *Am. J. Physiol.*, 243 (Endocrinol. Metab.): 272-7, 1982.
- CORDERO, M.E.; TREJO, M.; COLOMBO, M.; ARANDA, V. Histological maturation of the neocortex in phenylketonuric rats. *Early Human Development*, 8: 157-73, 1983.
- COPENHAVER, J.H.; VACANTI, J.P.; CARVER, M.J. Experimental maternal hyperphenylalaninemia; disaggregation of fetal brain ribosomes. *J. Neurochem.*, 21: 273-80, 1973.
- CREMER, J.E.; BRAUN, L.D.; OLDENDORF, W.H. Changes during development in transport process of the blood-brain barrier. *Biochem. Biophys. Acta*, 448: 633-7, 1976.
- DAVID, J.-C.; DAIRMAN, W.; UDENFRIEND, S. On the importance of decarboxylation in the metabolism of phenylalanine, tyrosine and tryptophan. *Arch. Biochem. Biophys.*, 160: 561-8, 1974.

- DAVIS, P.H. & SQUIRE, L.R. Protein synthesis and memory: A Review. *Psychological Bulletin*, 96(3): 518-59, 1984.
- DAVISON, A.N. & SANDLER, M. Inhibition of 5-hydroxytryptophan decarboxylase by phenylalanine metabolites. *Nature (London)*, 181: 186-7, 1958.
- DEL VALLE, J.A.; DIENEL, G.; GREENGARD, O. Comparison of α -methylphenylalanine and p.chlorophenylalanine as inducers of chronic hyperphenylalaninaemia in developing rats. *Biochem. J.*, 170: 449-59, 1978.
- DILLEHAY, L.; BASS, R.; ENGLESBERG, E. Inhibition of growth of cells in cultures by L-phenylalanine as a model system for the analysis of phenylketonuria. I. Amino acid antagonism and the inhibition of protein synthesis. *J. Cell. Physiol.*, 102: 395-405, 1980.
- DOBBING, J. & SANDS, J. Timing of neuroblast multiplication in developing human brain. *Nature (London)*, 226: 639-40, 1970.
- DOBSON, J.C.; WILLIAMSON, M.L.; AZEN, C.; KOCH, C. Intellectual assesment of 111 four-year-old chindren with phenylketonuria. *Pediatrics*, 60: 822-7, 1977.
- DOWNE, N.M. & HEAT, R.W. *Basic Statistical Methods*. New York, Harper & Row, 1970.
- EDWARDS, D.J. & BLAU, K. Aromatic derived from phenylalanine in the tissues of rats with experimentally induced phenylketonuric - like characteristics. *Biochem. J.*, 130: 495-503, 1972.
- FALLON, H.J.; HACKNEY, E.J.; BYRNE, W.L. Serine biosynthesis in rat liver. *J. Biol. Chem.*, 241(18): 4157-67, 1966.
- FELLMAN, J.H. Inhibition of DOPA decarboxylase by aromatic acids associated with phenylpyruvic oligophrenia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 93: 413-4, 1956.
- FIGLEWICZ, D.A. & DRUSE, M.J. Experimental hyperphenylalaninaemia: Effect of central nervous system myelin subfraction. *Exp. Neurol.*, 67: 315-29, 1980.
- FLUHARTY, S.J.; SNYDER, G.L.; ZIGMOND, M.J.; STRICKER, E.M. Tyrosine hydroxylase activity and catecholamine biosynthesis in the adrenal medulla of rats during stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 233: 32-8, 1985.
- FREEDLAND, R.A.; KRAKOWSKI, M.C.; WAISMAN, H.A. Effect of age, sex and nutrition on liver phenylalanine hydroxylase activity in rats. *Am. J. Physiol.*, 202(1): 145-8, 1962.

- FRIEDMAN, P.A.; KAPPELMAN, A.H.; KAUFMAN, S. Partial purification and characterization of tryptophane hydroxylase from rabbit hindbrain. *J. Biol. Chem.*, 247: 4165-73, 1972.
- FRIEDMAN, P.A. & KAUFMAN, S. Some characteristics of partially purified human liver phenylalanine hydroxylase. *Biochim. Biophys. Acta*, 293: 56-61, 1973.
- FULTON, T.R.; TRIANO, T.; RABE, A.; LOO, Y.H. Phenylacetate and the enduring behavioral deficit in experimental PKU. *Life Sci.*, 27: 1271-81, 1980.
- GIBSON, C.J.; DEIKEL, S.M.; YOUNG, S.N.; BINIK, Y.M. Behavioural and biochemical effect of tryptophan, tyrosine and phenylalanine in mice. *Psychopharmacol.*, 76: 118-21, 1982.
- GLICK, S. & GREENGARD, O. Exaggerated lateralization in rats after early postnatal hyperphenylalaninemia. *Brain Res.*, 202: 243-8, 1980.
- GRAU, C.R. & STEELE, R. Phenylalanine and tyrosine utilization in normal and phenylalanine-deficient young mice. *J. Nutr.*, 53: 591-71, 1954.
- GRAHAM-JONES, S.; FILLENZ, M.; GRAY, J.A. The effects of footshock and handling on tyrosine hydroxylase activity in synaptosomes and solubilized preparations from rat brain. *Neuroscience*, 9: 679-85, 1983.
- GREEN, H.; GREENBERG, S.M.; ERICKSON, R.W.; SAWYER, J.L.; ELLISON, T. Effect of dietary phenylalanine and tryptophan upon rat brain amine levels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 136: 174-8, 1962.
- GREENGARD, O.; YOSS, M.C.; DEL VALLE, J.A. α -Methylphenylalanine, a new inducer of chronic hyperphenylalaninaemia in suckling rats. *Science*, 192: 1007-8, 1976.
- GREENGARD, O. & BRASS, C.A. Developmental changes of cerebral phenylalanine uptake from severely elevated blood levels. *Neurochem. Res.*, 9(6): 837-47, 1984.
- GUROFF, G. & UNDEFRIEND, S. Studies on aromatic amino acid uptake by rat brain "in vivo". *J. Biol. Chem.*, 237(3): 803-6, 1962.
- GUTHRIE, R. & SUSI, A. A simple phenylalanine method for a detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*, 32: 338-43, 1963.
- GÜTTLER, F. Hyperphenylalaninemia. Diagnosis and classification of the various types of phenylalanine hydroxylase deficiency in childhood. *Acta Paediatr. Scand.*, Suppl., 280, 1980.

- GÜTTLER, F. Phenylketonuria: 50 years since Fölling's discovery and still expanding our clinical and biochemical knowledge. *Acta Paediatr. Scand.*, 73: 705-16, 1984.
- HESS, S.M. & UDENFRIEND, S. A fluorometric procedure for the measurement of tryptamine in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 127: 175-7, 1959.
- HOMMES, F.A.; ELLER, A.G.; TAYLOR, E.H. The effects of phenylalanine on myelin metabolism in adolescent rats. In: COCKBURN, F. & GITZELMANN, R. *Inborn Errors of Metabolism in Humans*. Lancaster, England, MTP. Press Limited International Medical Publishers, 1982. pp. 193-9.
- HORWITZ, I. & WAISSMAN, H.A. Some biochemical changes in hamsters fed excess phenylalanine diets. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 122: 750-4, 1966.
- HSIA, D. Y-Y; NISHIMURA, K.; BRENCHLEY, Y. Mechanism for the decrease of brain serotonin. *Nature*, 200: 578, 1963.
- HUETHER, G.; SCHOTT, K.; NEUHOFF, V. Decreased concentration of tryptophan and serotonin in the brain of developing hyperphenylalaninemic rats. A contribution to the understanding of the metabolic defects in phenylketonuria. *Progress in Tryptophan and Serotonin Research*, 429-35, 1984.
- HUETHER, G.; KLAUS, R.; NEUHOFF, V. Amino acid depletion in the blood and brain tissue of hyperphenylalaninemic rats is abolished by the administration of additional lysine: a contribution to the understanding of the metabolic defects in phenylketonuria. *Biochem. Med.*, 33: 334-41, 1985.
- HUGHES, J.V. & JOHNSON, T.C. The effects of phenylalanine on amino acids metabolism and protein synthesis in brain cells "in vitro". *J. Neurochem.*, 26(6): 1105-13, 1976.
- HUGHES, J.Y. & JOHNSON, T.C. The effects of hyperphenylalaninaemia on the concentration of aminoacyltransfer ribonucleic acid "in vivo". *Biochem. J.*, 162: 527-37, 1977.
- HUGHES, J.V. & JOHNSON, T.C. Experimentally induced and natural recovery from the effects of phenylalanine on brain protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 517: 473-85, 1978.
- IKEDA, M.; LEVITT, M.; UDENFRIEND, S. Hydroxylation of phenylalanine by purified preparations of adrenal and brain tyrosine hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 18: 482-88, 1965.
- IKEDA, M.; LEVITT, M.; UDENFRIEND, S. Phenylalanine as substrate and inhibitor of tyrosine hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 120: 420-7, 1967.

- ISAACS, C.E. & GREENGARD, O. The effect of hyperphenylalaninaemia on glycine metabolism in developing rat brain. *Biochem. J.*, 192: 441-8, 1980.
- IZQUIERDO, I.; SALZANO, F.; THOMÉ, F.; THADDEU, R. Shuttle behaviour in weanling and adult rats. *Behav. Biol.*, 14: 361-6, 1975.
- IZQUIERDO, I. & DIAS, R.D. Memory as a state-depend phenomenon: role of ACTH and epinephrine. *Behav. Neural. Biol.*, 38: 144-51, 1983.
- JAKUBOVIC, A. Phenylalanine-hydroxylating system in the human fetus at different developmental ages. *Biochem. Biophys. Acta*, 237: 469-75, 1971.
- JERVIS, G.A.; BLOCK, R.J.; BOLLING, D.; KANZE, E. Chemical and metabolic studies on phenylalanine; phenylalanine content of blood and spinal fluid in phenylpyruvic oligophrenia. *J. Biol. Chem.*, 134: 105-13, 1940.
- JERVIS, G.A. Studies on phenylpyruvic oligophrenia. The position of the metabolic error. *J. Biol. Chem.*, 169: 651-6, 1947.
- JERVIS, G.A. Excretion of phenylalanine and derivatives in phenylpyruvic oligophrenia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 75: 83-6, 1950.
- JERVIS, G.A. Studies on phenylpyruvic oligophrenia. Phenylpyruvic acid content of blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 81: 715-20, 1952.
- JERVIS, G.A. Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidizing system. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 82: 514-5, 1953.
- JOHNSON, R.C. & SHAH, S.N. Effect of hyperphenylalaninaemia induced during suckling on brain DNA metabolism in rats pups. *Neurochem. Res.*, 9(4): 517-27, 1984.
- KANEYUKI, T.; MORIMASA, T.; SHOHMORI, T. Relationship of tyrosine concentration to catecholamine levels in rat brain. *Acta Med. Okayama*, 38: 403-7, 1984.
- KAUFMAN, S. A new cofactor required for the enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. *J. Biol. Chem.*, 230: 931-9, 1958.
- KAUFMAN, S. The structure of the phenylalanine hydroxylation cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 50: 1085-93, 1963.
- KAUFMAN, S. Metabolism of phenylalanine hydroxylation cofactor. *J. Biol. Chem.*, 242: 3934-43, 1967.

- KAUFMAN, S. & FISHER, D.B. Purification and some physical properties of phenylalanine hydroxylase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 245: 4745-50, 1970.
- KENNEY, F.T., REEM, G.H., KREITCHMER, N. Development of phenylalanine hydroxylase in mammalian liver. *Science*, 127: 86, 1958.
- KNOX, E.W. Phenylketonuria. In: STANBURY, J.B., WYNGAARDEN, J.B. & FREDRICKSON, D.S. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. 3 ed. New York, Mc Graw Hill, 1972, p.266-95.
- KOHSAKA, S. & TSUKADA, Y. Neurochemical and behavioral studies on the experimental phenylketonuric rats. *Keio J. Med.*, 38: 97-108, 1979.
- KOE, B.K. & WEISSMAN, A. p-Chlorophenylalanine: a specific depletor of brain serotonin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 154: 499-516, 1966.
- KRAUSE, W.; HALMINSKI, M.; Mc DONALD, L., DEMBURE, P.; SALVO, R.; FREIDES, D.; ELSAS, L. Biochemical and neuropsychological effects of elevated plasma phenylalanine in patients treated phenylketonuria. *J. Clin. Invest.*, 75: 40-8, 1985.
- LAJTHA, A. & TOTH, J. The barrier system - III. The efflux of intracerebrally administered amino acids from the brain. *J. Neurochem.*, 9: 199-212, 1962.
- LANE, J.D.; SCHÖNE, B.; LANGENBECK, U.; NEUHOFF, V. Characterization of experimental phenylketonuria: Augmentation of hyperphenylalaninaemia with α -methylphenylalanine and p-chlorophenylalanine. *Biochem. Biophys. Acta*, 627: 144-56, 1980.
- LEVIN, J. *Estatística Aplicada a Ciências Humanas*. São Paulo, Harper & Row, 1978.
- LINDROOS, O.F.C. & OJA, S.S. Hyperphenylalaninaemia and exchange of tyrosine in adult rat brain. *Exp. Brain Res.*, 14: 48-60, 1971.
- LIPTON, M.A.; GORDON, R.; GUROFF, G.; UDENFRIEND, S. p-Chlorophenylalanine-induced chemical manifestations of phenylketonuria in rats. *Science*, 156: 248-50, 1967.
- LOO, Y.H.; FULTON, .; MILLER, K.; WISNIEWSKI, M.H. Phenylacetate effects synaptic development. *Life Science*, 27 (14): 1280-89, 1980.
- LOWDEN, J.A. & LA RAMEE, M.A. Hyperphenylalaninemia: The effect of cerebral amino acid levels during development. *Can. J. Biochem.*, 47: 883-8, 1969.
- LUTTGES, W.M. & GERREN, R.A. Postnatal α -methylphenylalanine treatment effects on adult mouse locomotor activity and avoidance learning. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 11: 493-8, 1979.

- MASSERANO, J.M. & WEINER, N. Tyrosine hydroxylase regulation in the central nervous system. *Mol. Cell. Biochem.*, 53/54: 129-52, 1983.
- Mc CAMAN, M.W. & ROBINS, E. Fluorometric method for the determination of phenylalanine in serum. *J. Lab. Clin. Med.*, 59: 885-90, 1962.
- Mc KEAN, C.M.; SCHAMBERG, S.M.; GIARMAN, N.J. A mechanism of the indole defect in experimental phenylketonuria. *Science*, 137: 604-5, 1962.
- Mc KEAN, C.M. & BOGGS, D.E. Influence of high concentrations of phenylalanine on the amino acids of cerebrospinal fluid and blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 122: 987-91, 1966.
- Mc KEAN, C.M.; SCHAMBERG, S.M.; GIARMAN, N.J. Aminoacidemias: effects on maze performance and cerebral serotonin. *Science*, 157: 213-5, 1967.
- Mc KEAN, C.M.; BOGGS, D.E.; PETERSON, N.A. The influence of high phenylalanine and tyrosine on the concentrations of essential amino acids in brain. *J. Neurochem.*, 15: 235-41, 1968.
- Mc KEAN, C.M. The effects of high phenylalanine concentrations on serotonin and catecholamine metabolism in human brain. *Brain Res.*, 47: 469-76, 1972.
- MENKES, J.H. The pathogenesis of mental retardation in phenylketonuria and other inborn errors of aminoacid metabolism. *Pediatrics*, 39: 297-308, 1967.
- MERCER, J.F.B.; GRIMES, A.; JENNIGS, I.; COTTON, R.G.H. Rat phenylalanine hydroxylase segregation. *Biochem. J.*, 219: 891-8, 1984.
- MOLDAWER, L.I.; KAWAMURA, I.; BISTRAN, B.R.; BLACKBURN, G.L. The contribution of phenylalanine to tyrosine metabolism "in vivo". Studies in the post-absorptive and phenylalanine-loaded rat. *Biochem. J.*, 210: 811-7, 1983.
- MOSS, A.R. & SCHOENHEIMER, R. The conversion of phenylalanine to tyrosine in normal rats. *J. Biol. Chem.*, 135: 415-29, 1940.
- NADLER, H.L. & HSIA, D.Y.Y. Epinephrine metabolism in phenylketonuria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 107: 721-3, 1961.
- NAGATA, H. & HITOSHI, F. Purification and characterization of phenylalanine 4-monooxygenase from rat liver. *Biochem. Biophys. Acta*, 614: 225-327, 1984.

- NETTO, C.A. *O papel do sistema β -eudorfinico cerebral na modulação de memória.* Porto Alegre, 1984. Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da UFRGS.
- NETTO, C.A., DIAS, R.D.; IZQUIERDO, I. Differential effect of post-training naloxone, Beta-endorphin, Leu-enkephalin and eletroconvulsive shock administration upon memory of an open-field habituation and of water-finding task. *Psychoneuroendocrinology*, 1986 (in press).
- NYHAN, W.L. Phenylketonuria. In: BERGSMAN, D. *Birth Defects compendium*. 2 ed. New York, Alan R. Liss. Inc., 1979, pp. 866-7.
- OLDENDORF, W.H. Saturation of blood brain barrier transport of amino acids in phenylketonuria. *Arch. Neurol.*, 28: 45-8, 1973.
- PARE, C.M.B.; SANDLER, M.; STACEY, R.S. 5-Hydroxytryptamine deficiency in phenylketonuria. *Lancet*, 551-3, 1957.
- PARE, C.M.B.; SANDLER, M.; STACEY, R.S. Decreased 5-hydroxytryptophan decarboxylase activity in phenylketonuria. *Lancet*, 2: 1099-101, 1958.
- PARE, C.M.B.; SANDLER, M.; STACEY, R.S. The relationship between decreased 5-hidroxyindole metabolism and mental defect in phenylketonuria. *Arch. Dis. Childhood*, 34: 422-5, 1959.
- PARDRIDGE, W.M. & OLDENDORF, W.H. Kinetics analysis of blood-brain barrier transport of amino acids. *Biochem. Biophys. Acta*, 401: 128-36, 1975.
- PARDRIDGE, W.M. The rote of blood-brain barrier transport of tryptophan and other neutral amino acids in the regulation of substrate-limited pathways of brain amino acid metabolism. *J. Neural. Transm.*, 15(Suppl.): 43-54, 1979.
- PARTINGTON, M.W. & LEWIS, E.J. Variations with age in plasma phenylalanine and tyrosine levels in phenylketonuria. *J. Pediatrics*, 62: 348-57, 1963.
- PENROSE, L. & QUASTEL, J.H. Metabolic studies in phenylketonuria. *Biochem. J.*, 31: 266-74, 1937.
- PERRY, T.L.; LING, G.M.; HANSEN, S.; Mac DOUGALL, L. Unimpaired learning ability of rats made artificially phenylketonuria during fetal a neonatal life. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 119: 282-7, 1965.
- PHILIPPS, R.E. Tyrosine in serum. In: TURNER, G.K. *Manual of Fluorometric Clinical Procedures*. Palo Alto, G.K. Turner Associates, 1967.
- PIEL, N.; LANE, D.J.; HÜETHER, G.; NEUHOFF, V. Impaired permeability of blood-cerebrospinal fluid barrier in hyperphenylalaninaemia. *Neuropediatrics*, 13: 88-92, 1982.

- POLIDORA, V.J.; CUNNINGHAM, R.F.; WAISMAN, H.A. Phenylketonuria in rats: reversibility of behavior deficit. *Science*, 151: 219-21, 1966.
- POLIDORA, V.J. Behavior effects of phenylketonuria in rats. *Psychology*, 57: 102-6, 1967.
- PRATT, O.E. Kinetics of tryptophan transport across blood-brain barrier. *Neural Trans. Suppl.*, 15: 29-42, 1979.
- PRATT, O.E. Transport inhibition in the pathology of phenylketonuria and other inherited metabolic diseases. *J. Inher. Metab. Dis.*, 5 (Suppl. 2): 75-81, 1982.
- PRENSKY, A.L.; FISHMAN, M.A.; DAFTARI, B. Differential effects of hyperphenylalaninemia on the development of the brain in the rat. *Brain Res.*, 33: 181-91, 1971.
- PRONCZUK, A.W.; BALIGA, B.S.; TRIANT, J.W.; MUNRO, H.N. Comparison of the effect of amino acid supply on hepatic polyssome profiles "in vivo" and "in vitro". *Biochim. Biophys. Acta*, 157: 204-6, 1968.
- RÄIHÄ, N.C.R. Phenylalanine hydroxylase in human liver during development. *Pediat. Res.*, 7: 1-4, 1973.
- RASMUSSEN, D.D.; ISHIZUKA, B.; QUIGLEY, M.E.; YEN, S.S.C. Effects of tyrosine and tryptophan ingestion on plasma catecholamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid concentrations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 57: 760-3, 1983.
- REINSTEIN, D.K.; LEHNERT, H.; SCOTT, N.A.; WURTMAN, R.J. Tyrosine prevents behavioral and neurochemical correlates of an acute stress in rats. *Life Science*, 34: 2225-31, 1984.
- RIGGS, T.R.; POTE, K.G.; IM, H.S.; HUFF, D.W. Developmental changes in the neutral α -amino acid transport system of rat brain over the first three weeks after birth. *J. Neurochem.*, 42: 1251-9, 1984.
- ROBERTS, S. & MORELOS, B.S. Role of ribonuclease action in phenylalanine-induced desaggregation of rat cerebral polyribosomes. *J. Neurochem.*, 26: 387-400, 1976.
- ROBERTS, S. & MORELOS, B.S. Cerebral ribosomal protein phosphorylation in experimental hyperphenylalaninaemia. *Biochem. J.*, 190: 405-19, 1980.
- RODWELL, V.W. Conversion of amino acids to specialized products. In: MARTIN, D.W. Jr.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. *Harper's Review of Biochemistry*. 19 ed. Los Altos, California. Lange Medical Publication, 1983. pp. 283-306.

- SANDLER, M. Inborn errors and disturbances of central neurotransmission (with special reference to phenylketonuria). *J. Inher. Metab. Dis.*, 5 (Suppl. 2): 65-70, 1982.
- SCHALOCK, R.L. & KLOPPER, F.D. Phenylketonuria: Enduring behavioral deficits in phenylketonurie rats. *Science*, 155: 1033-5, 1967.
- SCHALOCK, R.L.; BROWN, W.J.; COPENHAVER, J.H.; GUNTER, R. Model phenylketonuria in the albino rat. Behavioral biochemical and neuroanatomic effects. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 89: 655-66, 1975.
- SCHAMBERG, S. & GIARMAN, N.J. Uptake of 5-hydroxytryptophan by rat brain. *Biochim. Biophys. Acta*, 41: 556-8, 1960.
- SCHLESINGER, K.; SCHREIBER, R.A.; GRIEK, B.J.; HENRY, K.R. Effects of experimentally induced phenylketonuria on seizures susceptibility in mice. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 67: 149-55, 1969.
- SCRIVER, C.R. & CLOW, C.L. Phenylketonuria: Epitome of human biochemical genetics. *The New Engl. J. Med.*, 303: 1336-42, 1980a.
- SCRIVER, C.R. & CLOW, C.L. Phenylketonuria: Epitome of human biochemical genetics. *The New Engl. J. Med.*, 303: 1394-400, 1980b.
- SHAH, S.N.; PETERSON, N.A.; Mc KEAN, C.M. Inhibition of sterol synthesis "in vitro" by metabolites of phenylalanine. *Biochem. Biophys. Acta*, 187: 236-42, 1969.
- SHAH, S.N.; PETERSON, N.A.; Mc KEAN, C.M. Lipid composition of human cerebral white matter and myelin in phenylketonuria. *J. Neurochem.*, 19: 2369-76, 1972.
- SHEN, R.S.; FRITZ, R.R.; ABELL, C.W. Clearance of phenylalanine ammonia-lyase from normal and tumor bearing mice. *Cancer Res.*, 37(4): 1051-6, 1977.
- SHIMAN, R.; AKINO, M.; KAUFMAN, S. Solubilization and partial purification of tyrosine hydroxylase from bovine adrenal medulla. *J. Biol. Chem.*, 246: 1330-40, 1971.
- SIDRANSKY, H.; BONGIORNO, M.; SARMA, D.S.R.; VERNEY, E. The influence of tryptophan on hepatic polyribosomes and protein synthesis in fasted mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 27: 242-8, 1967.
- SIEGEL, F.L.; AOKI, K.; COLWELL, R.E. Polyribosome disaggregation and cell-free protein synthesis in preparations from cerebral cortex of hyperphenylalaninemic rats. *J. Neurochem.*, 18: 537-47, 1971.

- SIEGEL, S. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. Tokyo. McGraw-Hill, 1956.
- SILBERBERG, D.H. Phenylketonuria metabolites in cerebellum culture morphology. *Arch. Neurol.*, 17: 524-9, 1967.
- SNODGRASS, S.R. Phenylalanine, brain phenethylamine and motor activity in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.*, 26: 931-6, 1974.
- SMITH, I.; LOBASCHER, M.E.; STEVENSON, J.E.; WOLFF, O.H.; SCHMIDT, H.; GRUBEL-KAISER, S.; NICKEL, H. Effect of stopping low-phenylalanine diet on intellectual progress of children with phenylketonuria. *Br. Med. J.*, 2(6139): 723-6, 1978.
- SOUZA, D.O. *Estudo neuroquímico de aprendizado aversivo em ratos*. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1980. Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da UFRJ.
- STRUPP, B.J.; LEVITSKY, D.A.; BLUMSTEIN, L. PKU, learning, and models of mental retardation. *Develop. Psychobiol.*, 17(2): 109-20, 1984.
- TAUB, F. & JOHNSON, T.C. The mechanism of polyribosome desaggregation in brain tissue by phenylalanine. *Biochem. J.*, 151: 173-80, 1975.
- THURMOND, J.B.; KRAMACY, N.R.; LASLEY, S.M.; BROWN, J.W. Dietary amino acid precursors: effect on central monoamines, aggression and locomotor activity in mouse. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 12: 525-32, 1980.
- TORCHIANA, M.L.; PORTER, C.C.; STONE, C.A.; HANSON, H.M. Some biochemical and pharmacological actions of α -methylphenylalanine. *Biochem. Pharmacol.*, 19: 1601-14, 1970.
- TOURIAN, A. Activation of phenylalanine hydroxylase by phenylalanine. *Biochem. Biophys. Acta.*, 242: 345-54, 1971.
- TOURIAN, A. & SIDBURY, J.B. Phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. In: STAMBURY, J.B.; WYNGAARDEN, J.B.; FREDRICKSON, D.S. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. 5 ed, New York, McGraw Hill, 1983, p.270-86.
- TURNBULL, B.A.; TRAFICANTE, L.J.; MILLER, L.H. Decreased tyrosine metabolite concentrations in regions of mouse brain following acute stress. *I.R.C.S. Med. Sci.*, 11: 870, 1983.
- UDENFRIEND, S. & COOPER, J.R. The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. *J. Biol. Chem.*, 194: 503-11, 1952.
- VALDIVIESO, F.; GIMENEZ, C.; MAYOR, F. "in vivo" inhibition of rat liver phenylalanine hydroxylase by p-clorophenylalanine and esculin. Experimental model of phenylketonuria. *Biochem. Med.*, 12(1): 72-8, 1975.

- WAISSMAN, H.A.; WANG, H.L.; PALMER, G.; HARLOW, H.F.
Phenylketonuria in infant monkeys. *Nature* (London), 188:
1124-5, 1960.
- WEBER, G. Inhibition of human brain pyruvate kinase and
hexoquinase by phenylalanine and phenylpyruvate: possible
relevance to phenylketonuric brain damage. *Proc. Nat. Acad.
Sci., USA*, 1365-9, 1969.
- WIGGINS, R.C. Myelin development and nutritional insufficiency.
Brain Research Reviews, 4: 151-75, 1982.
- WILLIAMSON, M.; KOCH, R.; BERLOW, S. Diet discontinuation in
phenylketonuria. *Pediatrics*, 63(5): 823-4, 1979.
- WINICK, M.; ROSSO, P.; WATERLOW, J. Cellular growth of
cerebrum, cerebellum and brain stem in normal and marasmic
children. *Exp. Neurol.*, 26: 393-400, 1970.
- WOO, S.L.; GILLAM, S.S.; WOOLF, L.I. The isolation and
properties of phenylalanine hydroxylase from human liver.
Biochem. J., 139: 731-9, 1974.
- WOOLEY, D.W. & van der HOEVEN, T.H. Alterations in learning
ability caused by changes in cerebral serotonin and catechol
amines. *Science*, 139: 610-1, 1963.
- WOOLEY, D.W. & van der HOEVEN, T. Serotonin deficiency in
infancy is one cause of a mental defect in phenylketonuria.
Science, 144: 883-4, 1964.
- WURTMAN, R.J.; HEFTI, F.; MELAMED, E. Precursor control of
neurotransmitter synthesis. *Pharmacol. Rev.*, 32: 315-35, 1980.
- WURTMAN, R.J. Effects on parenteral amino acid mixtures on the
nervous system. *New Aspects of Clinical Nutrition*, 464-73,
1983.
- YUWILER, A. & LOUTTIT, R.T. Effects of phenylalanine diet on
brain serotonin in the rat. *Science*, 134: 831-2, 1961.
- YUWILER, A.; GELLER, E.; SLATER, G.G. On the mechanism of
the brain serotonin depletion in experimental phenylketonuria.
J. Biol. Chem., 240: 1170-4, 1965.

APÊNDICE

1) Resultados das dosagens de fenilalanina, tirosina e triptofãnio em soro e cêrebro de ratos que receberam administração intraperitoneal de solução salina 0,85 g% em volume de 2,5 ml . 100 g⁻¹ de peso corporal, em vários tempos após sua administração.

	Soro (mg.100 ml ⁻¹)	Cêrebro (mg.100 g ⁻¹)
a) Fenilalanina		
Tempo 0 (min.)	1,55 ± 0,23 (11)	2,41 ± 0,16 (9)
30	1,37 ± 0,08 (8)	2,10 ± 0,07 (8)
60	1,29 ± 0,05 (8)	2,19 ± 0,13 (8)
90	1,36 ± 0,11 (8)	1,97 ± 0,12 (8)
120	1,29 ± 0,05 (8)	2,14 ± 0,11 (8)
210	1,31 ± 0,11 (9)	1,15 ± 0,05 (9)
b) Tirosina		
Tempo 0 (min.)	1,74 ± 0,11 (11)	1,50 ± 0,13 (12)
30	2,24 ± 0,10 (8)	2,18 ± 0,24 (8)
60	2,04 ± 0,14 (8)	2,15 ± 0,14 (8)
90	1,86 ± 0,11 (8)	1,67 ± 0,09 (8)
120	1,61 ± 0,07 (8)	1,33 ± 0,11 (8)
210	1,16 ± 0,07 (9)	0,71 ± 0,03 (9)

c) Triptofânio	Soro (mg.100 ml ⁻¹)	Cérebro (mg.100 g ⁻¹)
Tempo 0 (min.)	3,17 ± 0,13 (8)	1,07 ± 0,11 (8)
30	2,19 ± 0,22 (7)	0,82 ± 0,02 (8)
60	2,50 ± 0,14 (7)	0,78 ± 0,05 (8)
90	2,06 ± 0,23 (6)	0,77 ± 0,05 (8)
120	2,29 ± 0,23 (8)	0,98 ± 0,07 (8)
210	3,26 ± 0,09 (7)	0,91 ± 0,07 (8)

Os resultados estão expressos em média ± erro padrão (entre parêntesis, o número de ratos).

2) Resultados das dosagens de fenilalanina, tirosina e triptofânio em soro e cérebro de ratos que receberam administração intraperitoneal de fenilalanina 4 g% em salina em volume de 2,5 ml . 100 g⁻¹ de peso corporal, em vários tempos após a administração do aminoácido:

a) Fenilalanina	Soro (mg.100 ml ⁻¹)	Cérebro (mg.100 g ⁻¹)
Tempo 0 (min.)	1,55 ± 0,23 (11)	2,41 ± 0,16 (9)
15	78,14 ± 5,73 (6)	7,31 ± 0,39 (6)
30	77,35 ± 3,36 (9)	12,55 ± 0,70 (10)
60	66,55 ± 2,93 (9)	15,68 ± 0,63 (10)
90	42,14 ± 2,96 (10)	15,04 ± 0,83 (12)
120	14,62 ± 2,79 (21)	8,24 ± 1,18 (21)
210	1,55 ± 0,13 (7)	2,64 ± 0,36 (6)

	Soro (mg.100 ml ⁻¹)	Cérebro (mg.100 g ⁻¹)
b) Tirosina		
Tempo 0 (min.)	1,74 ± 0,11 (11)	1,50 ± 0,13 (12)
15	6,94 ± 0,40 (5)	1,89 ± 0,18 (7)
30	7,83 ± 0,52 (11)	1,93 ± 0,58 (11)
60	9,55 ± 0,73 (8)	3,58 ± 0,16 (8)
90	9,46 ± 0,47 (12)	4,60 ± 0,34 (9)
120	8,28 ± 0,42 (18)	5,24 ± 0,43 (13)
150	3,58 ± 0,09 (7)	6,18 ± 0,52 (5)
210	2,72 ± 0,68 (7)	2,33 ± 0,33 (4)
c) Triptofânio		
Tempo 0 (min.)	3,17 ± 0,13 (8)	1,07 ± 0,11 (8)
15	2,21 ± 0,44 (5)	0,75 ± 0,18 (5)
30	2,49 ± 0,20 (11)	0,75 ± 0,11 (9)
60	2,49 ± 0,19 (8)	0,59 ± 0,11 (9)
90	2,65 ± 0,13 (13)	0,73 ± 0,07 (11)
120	2,89 ± 0,11 (19)	0,90 ± 0,06 (19)
150	2,73 ± 0,38 (5)	1,00 ± 0,20 (4)
210	2,99 ± 0,37 (4)	0,93 ± 0,12 (5)

Os resultados estão expressos em média ± erro padrão (entre parêntesis, o número de ratos).

3) Resultados das dosagens de fenilalanina, tirosina e triptofânio em soro e cérebro de ratos com prévia administração subcutânea de α -metilfenilalanina 1,43 g% em salina e administração intraperitoneal de solução salina 0,85 g% em volume de 2,5 ml . 100^{-g} de peso corporal, em vários tempos após a

administração da salina:

	Soro (mg.100 ml ⁻¹)	Cérebro (mg.100 g ⁻¹)
a) Fenilalanina		
Tempo 0 (min.)	3,37 ± 0,33 (6)	4,68 ± 0,40 (5)
30	2,40 ± 0,22 (5)	3,34 ± 0,36 (5)
60	2,61 ± 0,10 (5)	3,27 ± 0,25 (5)
90	2,66 ± 0,31 (6)	4,09 ± 0,36 (3)
120	2,71 ± 0,31 (5)	3,57 ± 0,41 (5)
210	2,37 ± 0,80 (3)	3,70 ± 0,43 (4)
b) Tirosina		
Tempo 0 (min.)	0,81 ± 0,18 (6)	0,56 ± 0,16 (6)
30	0,76 ± 0,11 (5)	0,52 ± 0,15 (5)
60	0,85 ± 0,14 (5)	0,52 ± 0,10 (5)
90	0,64 ± 0,18 (6)	0,59 ± 0,14 (5)
120	0,54 ± 0,27 (5)	0,51 ± 0,17 (5)
210	0,47 ± 0,08 (4)	0,49 ± 0,08 (4)
c) Triptofânio		
Tempo 0 (min.)	3,10 ± 0,15 (6)	1,02 ± 0,19 (6)
30	2,64 ± 0,34 (5)	1,08 ± 0,15 (5)
60	3,06 ± 0,33 (5)	1,51 ± 0,39 (5)
90	2,13 ± 0,33 (6)	1,91 ± 0,42 (4)
120	2,60 ± 0,30 (5)	0,84 ± 0,14 (4)
210	2,20 ± 0,45 (4)	1,02 ± 0,17 (4)

Os resultados estão expressos em média ± erro padrão (entre parêntesis, o número de ratos).

4) Resultados das dosagens de fenilalanina, tirosina e triptofã

nio em soro e cérebro de ratos com prévia administração subcutânea de α -metilfenilalanina 1,43 g% em salina e administração intraperitoneal de fenilalanina 3,6 g% em salina, em volume de $2,5 \text{ ml} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso corporal em vários tempos após a administração do aminoácido.

	Soro (mg.100 ml ⁻¹)	Cérebro (mg.100 g ⁻¹)
a) Fenilalanina		
Tempo 0 (min.)	3,37 ± 0,38 (6)	4,68 ± 0,40 (5)
30	68,63 ± 2,71 (5)	12,86 ± 0,73 (6)
60	61,51 ± 3,02 (5)	14,48 ± 1,02 (6)
90	34,45 ± 7,32 (5)	13,95 ± 0,73 (6)
120	21,41 ± 4,46 (7)	13,33 ± 0,85 (7)
210	3,00 ± 0,34 (4)	6,44 ± 0,32 (4)
b) Tirosina		
Tempo 0 (min.)	0,81 ± 0,18 (6)	0,56 ± 0,16 (6)
30	3,77 ± 0,58 (5)	0,77 ± 0,15 (5)
60	5,84 ± 1,32 (5)	1,30 ± 0,30 (6)
90	5,17 ± 0,93 (6)	1,80 ± 0,60 (6)
120	4,00 ± 0,51 (7)	2,42 ± 0,50 (7)
210	1,30 ± 0,74 (4)	1,67 ± 0,64 (4)
c) Triptofânio		
Tempo 0 (min.)	3,10 ± 0,15 (6)	1,02 ± 0,19 (6)
30	2,43 ± 0,10 (6)	0,53 ± 0,28 (6)
60	2,23 ± 0,06 (6)	0,44 ± 0,13 (6)
90	2,13 ± 0,10 (6)	0,57 ± 0,34 (6)
120	2,94 ± 0,10 (7)	0,78 ± 0,11 (7)

c) Triptofânio	<u>Soro</u> (mg.100 ml ⁻¹)	<u>Cérebro</u> (mg.100 g ⁻¹)
Tempo 210 (min.)	3,20 ± 0,06 (4)	0,69 ± 0,37 (4)

O resultados estão expressos em média ± erro padrão (entre parêntesis, o número de ratos).