

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

**EFEITOS DA FENILALANINA , FENILPIRUVATO E
ALANINA SOBRE AS ATIVIDADES DA ATP-
DIFOSFOIDROLASE (EC 3.6.1.5) E 5'- NUCLEOTIDASE
(EC 3.1.3.5) EM SINAPTOSSOMAS DE CÓRTEX
CEREBRAL DE RATOS**

SIMONE LUISA BERTI

**ORIENTADOR
CLÓVIS MILTON DUVAL WANNMACHER**

**CO-ORIENTADOR
JOÃO JOSÉ FREITAS SARKIS**

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

Porto Alegre - RS

**frente a um filho, somos santos
frente a um soco, somos fracos
frente a um rosto, somos meigos
frente a um doce, somos magros
frente a um bicho, somos gente
frente a um cego, somos raros
frente a um sonho, somos pobres
frente a um pobre, somos caros**

Martha Medeiros

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas especiais que , durante esta caminhada, estiveram atrás de mim, ao meu lado e à minha frente para que eu pudesse ser, o meu reconhecimento e gratidão.

À minha família, em especial aos meus pais

Aos meus orientadores

Aos meus colegas amigos e amigos colegas

Ao CNPq e ao Departamento de Bioquímica do ICBS da UFRGS

RESUMO

Estudos anteriores realizados no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo demonstraram que fenilalanina (Phe) 2,0 mM ou fenilpiruvato (PP) 5,0 mM, um metabólito desaminado da Phe, reduzem a atividade da ATP-difosfohidrolase em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos. Já estudos do efeito da Phe e do fenilactato sobre a atividade da Na^+K^+ -ATPase, enzima envolvida na manutenção do potencial de membrana e na integridade celular no cérebro, demonstraram seus efeitos inibitórios, bem como a reversão destes efeitos pela alanina (Ala), competitivamente. Por outro lado, quando testada isoladamente, a alanina não altera a atividade da enzima. Resultados semelhantes foram observados em relação à fosforilação de proteínas de citoesqueleto neuronal na presença de Phe e/ou Ala.

O presente estudo teve como principal objetivo caracterizar a inibição causada por Phe ou PP sobre a atividade da ATP-difosfohidrolase. Considerando que a ATP-difosfohidrolase participa com a 5'-nucleotidase na síntese de adenosina a partir do ATP e do ADP, decidimos investigar também os efeitos "*in vitro*" da Phe ou do PP sobre a atividade da 5'-nucleotidase na mesma fração. Além disso, considerando que a alanina reverte o efeito inibitório da Phe sobre algumas enzimas, decidimos investigar o efeito daquele aminoácido sobre as atividades da ATP-difosfohidrolase e da 5'-nucleotidase, bem como a possibilidade da alanina reverter efeitos inibitórios provocados pela Phe ou pelo PP sobre a atividade da ATP-difosfohidrolase. Os sinaptossomas foram preparados a partir de córtex cerebral de ratos com idade entre 25 e 35 dias para determinação das atividades da ATP-difosfohidrolase e da 5'-nucleotidase. A Phe ou o PP inibiram a atividade da ATP-difosfohidrolase em aproximadamente 20%, no entanto, a atividade da 5'-nucleotidase não

foi afetada pelos dois metabólitos. Os resultados dos estudos cinéticos realizados com ATP-difosfohidrolase sugerem que ADP, Phe e PP agem sobre o mesmo sítio da enzima. A alanina não altera as atividades da ATP-difosfohidrolase e da 5'-nucleotidase e, quando testada em associação com Phe 1,5 mM ou com PP 5,0 mM, não reverteu os efeitos inibitórios provocados pelos mesmos. Considerando a importância da atividade da ATP-difosfohidrolase para a degradação do neurotransmissor ATP em sistema nervoso central, se os efeitos observados "*in vitro*" também ocorrerem "*in vivo*", a inibição da enzima pode ser um dos mecanismos que levam ao dano cerebral característico da fenilcetonúria.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO.....	1
1.1.1 Fenilcetonúria.....	2
1.1.1.1 Histórico.....	2
1.1.1.2 Conceito e frequência.....	2
1.1.1.3 Metabolismo da L-fenilalanina e fenilalanina hidroxilase hepática.....	3
1.1.1.4 Diagnóstico.....	8
1.1.1.5 Aspectos clínicos.....	8
1.1.1.6 Aspectos fisiopatológicos.....	9
1.1.1.7 Tratamento.....	10
1.2 Neurotransmissão, co-transmissão, neuromodulação e apirase.....	11
1.3 ATP-difosfohidrolase (Apirase, EC 3.6.1.5) e 5'-nucleotidase (EC 3.1.1.5).....	12
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1.1 Reagentes químicos.....	21
3.1.2 Animais.....	21
3.2 Preparação sinaptossomal.....	21
3.3 Análise enzimática.....	21
3.4 Determinação das proteínas.....	21
3.5 Caracterização da inibição enzimática.....	22
3.6 Análise estatística.....	22
4. RESULTADOS.....	23

4.1 - Artigo submetido à publicação: EFFECTS OF PHENYLALANINE AND PHENYLPYRUVATE ON ATP-DIPHOSPHOHYDROLASE (EC 3.6.1.5) AND 5'-NUCLEOTIDASE (EC 3.1.3.5) ACTIVITIES IN SYNAPTOSOMES FROM CEREBRAL CORTEX OF RATS.....	23
4.2 - Resultados que não constam no artigo.....	44
4.2.1 - Efeito ' <i>in vitro</i> ' da alanina sobre as atividades da ATP-difosfoidrolase e da 5'-nucleotidase em fração sinaptossomal de córtex cerebral de ratos.....	44
4.2.2 - Efeito da alanina sobre a inibição causada pela fenilalanina e pelo fenilpiruvato sobre a atividade da ATP-difosfoidrolase em fração sinaptossomal de córtex cerebral de ratos.....	44
5. DISCUSSÃO.....	49
6. CONCLUSÕES.....	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

FIGURAS

Figura 1.1 - Reação de oxidação da fenilalanina hidroxilase.....	4
Figura 1.2 - Reação de hidroxilação da fenilalanina.....	5
Figura 1.3 - Vias catabólicas secundárias da fenilalanina.....	7
Figura 1.4 - Vias de degradação de nucleotídeos na fenda sináptica durante o processo de neurotransmissão.....	16
Figura 1.5 - Atividade catalítica e topografia de membrana das ecto-nucleotidases.....	17
Figura 4.1 - Efeito da alanina sobre a atividade da ATP-difosfohidrolase.....	45
Figura 4.2 - Efeito da alanina sobre a atividade da 5'-nucleotidase.....	46
Figura 4.3 - Efeito da alanina sobre a inibição causada por fenilalanina na atividade da ATP- difosfohidrolase	47
Figura 4.4 - Efeito da alanina sobre a inibição causada por fenilpiruvato na atividade da ATP- difosfohidrolase.....	48

ABREVIATURAS

ACR	-	Regiões Conservadas da Apirase (Apyrase Conserved Regions)
ADP	-	adenosina 5'-difosfato
Ala	-	alanina
AMP	-	adenosina 5'-monofosfato
AMPc	-	adenosina 3',5'-monofosfato
ATP	-	adenosina 5'-trifosfato
BH4	-	tetraidrobiopteridina
CD39	-	antígeno de ativação celular linfóide
DHR	-	diidropteridina
EBV	-	vírus Epstein Barr
EDTA	-	ácido etilenodiamino-tetracético
EIM	-	erro inato do metabolismo
HEPES	-	ácido N-2-hidroxietilpiperazina N'-2-etano sulfônico
NAD+	-	nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	-	nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADP+	-	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
NADPH	-	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
PAH	-	fenilalanina hidroxilase
Phe	-	fenilalanina
PKU	-	fenilcetonúria
Pi	-	fosfato inorgânico
PP	-	fenilpiruvato
QI	-	quociente de inteligência
RN	-	recém nascido
SNC	-	sistema nervoso central
SNP	-	sistema nervoso periférico

TCA	-	ácido tricloroacético
TRIS	-	tris (hidroximetil)-aminoetano
TRP	-	triptofano
Tyr	-	tirosina

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) constituem um grande e heterogêneo grupo de doenças genéticas, caracterizadas pela deficiência, ausência ou modificação estrutural de uma proteína, geralmente uma enzima. Embora a frequência isolada de cada EIM seja baixa, no conjunto as mais de quatro centenas destes distúrbios já descritas e caracterizadas bioquimicamente alcançam uma frequência estimada da ordem de 0,1% da população (Scriver, 1995).

Um dos aspectos clínicos mais comuns nos EIM consiste na alteração do desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). Apesar do conhecimento bastante grande sobre aspectos isolados da maioria destes distúrbios, ainda não se conhece nenhuma cadeia patogênica completa que ligue o defeito bioquímico primário (proteína anormal ou ausente) à função anormal do SNC (Herschkowitz, 1982). A principal dificuldade consiste em determinar a hierarquia das causas, distinguir entre causas e efeitos e relacionar alterações estruturais com alterações funcionais.

As doenças do metabolismo dos aminoácidos, mais especificamente as hiperfenilalaninemias, têm sido as mais pesquisadas dentre os EIM em todo o mundo. A intensificação destes estudos se justifica pela frequência relativamente alta na população e pela possibilidade de detecção precoce em recém-nascidos com eventual tratamento dietético prevenindo a instalação do quadro clínico.

O progresso nos campos da bioquímica e da genética permitiram explicar um grande número de enfermidades hereditárias com base num defeito enzimático geneticamente determinado. Os modelos animais de EIM, genéticos ou químicos, têm por finalidade mimetizar o distúrbio metabólico em seres humanos, embora nenhum modelo de EIM até hoje desenvolvido tenha sido completamente superponível ao defeito humano específico. Nos modelos químicos, a possibilidade de isolar cada etapa das alterações metabólicas e estudá-las contra um controle adequado parece ser a principal vantagem.

1.1.1 - Fenilcetonúria

1.1.1.1 - Histórico

Quando, em 1934, o Dr. Asbjorn Fölling , através de um minucioso exame clínico, observou duas crianças de uma mesma família que eram mentalmente retardadas, descobriu acidentalmente a fenilcetonúria. Estas crianças apresentavam um odor característico na urina, mas não apresentavam nenhum outro sinal ou sintoma, exceto o retardo mental.

Dando continuidade a estes estudos, Fölling e colaboradores analisaram a urina destas crianças, não detectando alterações nos exames de rotina. Porém, intrigado com seus achados em testes de coloração, Fölling elaborou um método para detectar uma substância desconhecida, que na presença de cloreto férrico apresentava uma coloração diferente. A substância desconhecida foi detectada: ácido fenilpirúvico. Outros testes com cloreto férrico foram realizados em 430 crianças com retardo mental, dentre os quais, 8 revelaram novos casos semelhantes.

Fölling hipotetizou uma associação entre retardo mental e excreção de fenilpiruvato na urina e sugeriu que esta nova doença era uma desordem do metabolismo da fenilalanina e a chamou de “Imbecilidade Fenilpirúvica”, a qual, mais tarde, foi denominada de “fenilcetonúria” (Penrose e Quastel, 1937).

O defeito metabólico foi detectado por Jervis, em 1947, que mostrou que a fenilalanina proveniente da dieta não era convertida em tirosina nestes pacientes. O sistema enzimático da conversão da fenilalanina (Phe) em tirosina (Tir) foi descrito em 1952 por Udenfriend e Cooper.

1.1.1.2 - Conceito e freqüência

A fenilcetonúria (PKU) é transmitida por herança autossômica recessiva (Scriver et al., 1995). Sua freqüência varia entre 1:10.000 a 1:15.000 recém-nascidos (RN) vivos (Wurtman e Wurtman, 1979) o que a coloca como um dos mais freqüentes EIM dos

aminoácidos em seres humanos. Caracteriza-se por um bloqueio na conversão de fenilalanina (Phe) em Tirosina (Tyr), reação catalizada pela fenilalanina hidroxilase (PAH) hepática (Jervis, 1952, 1953; Friedman et al., 1972). O defeito bioquímico ocorre na apoenzima. O cofator e a atividade da diidropteridina redutase (DHR) são normais (Scriver et al., 1989).

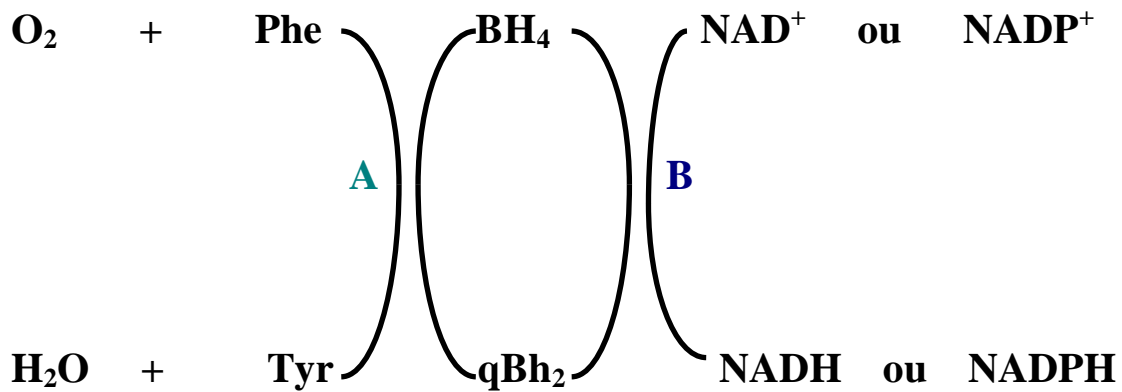
A deficiência do cofator da reação enzimática pode levar a outras formas de hiperfenilalaninemias (Scriver et al., 1995). Assim como na fenilcetonúria clássica, nas hiperfenilalaninemias em geral a conversão de Phe em Tyr está bloqueada, causando um acúmulo de Phe e metabólitos derivados do seu catabolismo no sangue e outros tecidos, bem como sua excreção em grande quantidade pela urina.

1.1.1.3 - Metabolismo da L-fenilalanina e fenilalanina hidroxilase

L-fenilalanina é um aminoácido nutricionalmente essencial e indispensável para a síntese protéica em tecidos de mamíferos (Womack e Rose, 1934). A principal via metabólica da Phe no organismo é a hidroxilação, cujo produto é a tirosina (Moss e Schoenheimer, 1940; Grau e Steele, 1954), sendo, no mínimo, metade da fenilalanina convertida em tirosina a cada passagem pelo fígado (Elwyn, 1970 - citado por Benedict et al., 1983).

A reação da hidroxilação da Phe envolve a participação, além do substrato e da enzima (PAH), da diidropteridina redutase (DHR), nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH), oxigênio e um mecanismo que envolve fosforilação e desfosforilação (Udenfriend e Cooper, 1952; Kaufman, 1958, 1963, 1967 e Scriver e Clow, 1980). A reação catalisada pela fenilalanina hidroxilase hepática está esquematizada na figura 1.1.

Quantidades estequiométricas de Phe, tetraidrobiopteridina (BH_4) e O_2 estão envolvidas na reação de hidroxilação da Phe; os produtos são Tyr, diidropteridina (qBH_2) e H_2O . A qBH_2 é uma substância instável e portanto pode sofrer um rearranjo e formar o tautômero 7,8 diidropteridina e, através da diidrofolato redutase, reconstituir a BH_4 . A reação catalisada por esta enzima está representada na figura 1.2.



**Figura 1.1 - Reação de oxidação da fenilalanina hidroxilase
(Scriver & Clow, 1980)**

A - Representa fenilalanina hidroxilase (PAH)

B - Representa diidropteridina redutase (DHR)

Abreviações: BH₄ (tetraidrobiopteridina), qBH₂ (diidropteridina), NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo), NADP⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), Phe (fenilalanina) e Tyr (tirosina).

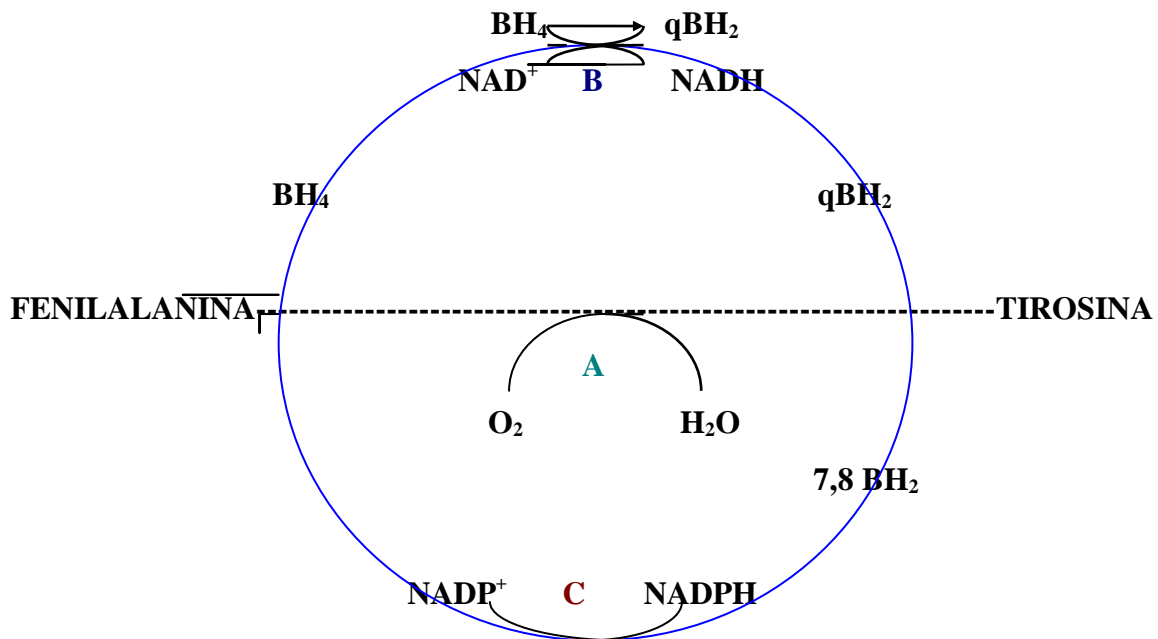


Figura 1.2 - Reação de hidroxilação da fenilalanina
(Scriver & Clow, 1980).

A - representa fenilalanina hidroxilase (PAH)

B - representa diidropteridina redutase (DHR)

C - representa diidrofolato redutase

Abreviações : BH_4 (tetraidropteridina), qBH_2 (diidropteridina) e sua forma tautomérica $7,8 BH_2$, NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e $NADP^+$ (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato).

A atividade da PAH é sensível a alterações na concentração de seu substrato (Tourian, 1971; Schiman e Gray, 1980). Dois tipos de mecanismos regulatórios que interagem sinergicamente permitem uma resposta mais segura entre a atividade da PAH e os níveis de Phe nos tecidos : ativação pela Phe e a ativação-desativação pela fosforilação-desfosforilação (Scriver et al., 1989).

O acúmulo de Phe no sangue e nos tecidos é decorrente da hidroxilação deficiente ativando vias catabólicas secundárias com grande produção de metabólitos que são excretados na urina em quantidades excessivas. A Phe pode originar fenilpiruvato por transaminação e feniletilamina por descarboxilação (David et al., 1974). As vias metabólicas da Phe estão representadas na figura 1.3.

O fenilactato, um dos metabólitos da Phe, pode entrar diretamente no cérebro através da circulação periférica ou ser formado dentro do mesmo (Edwards e Blau, 1972). O fenilpiruvato parece não atravessar a barreira hematoencefálica em ratos adultos (Conn e Steele, 1982), embora o faça em fetos e recém nascidos. Portanto, o aumento de seus níveis no cérebro de ratos adultos deve ocorrer por transaminação local da Phe (Conn e Steele, 1982).

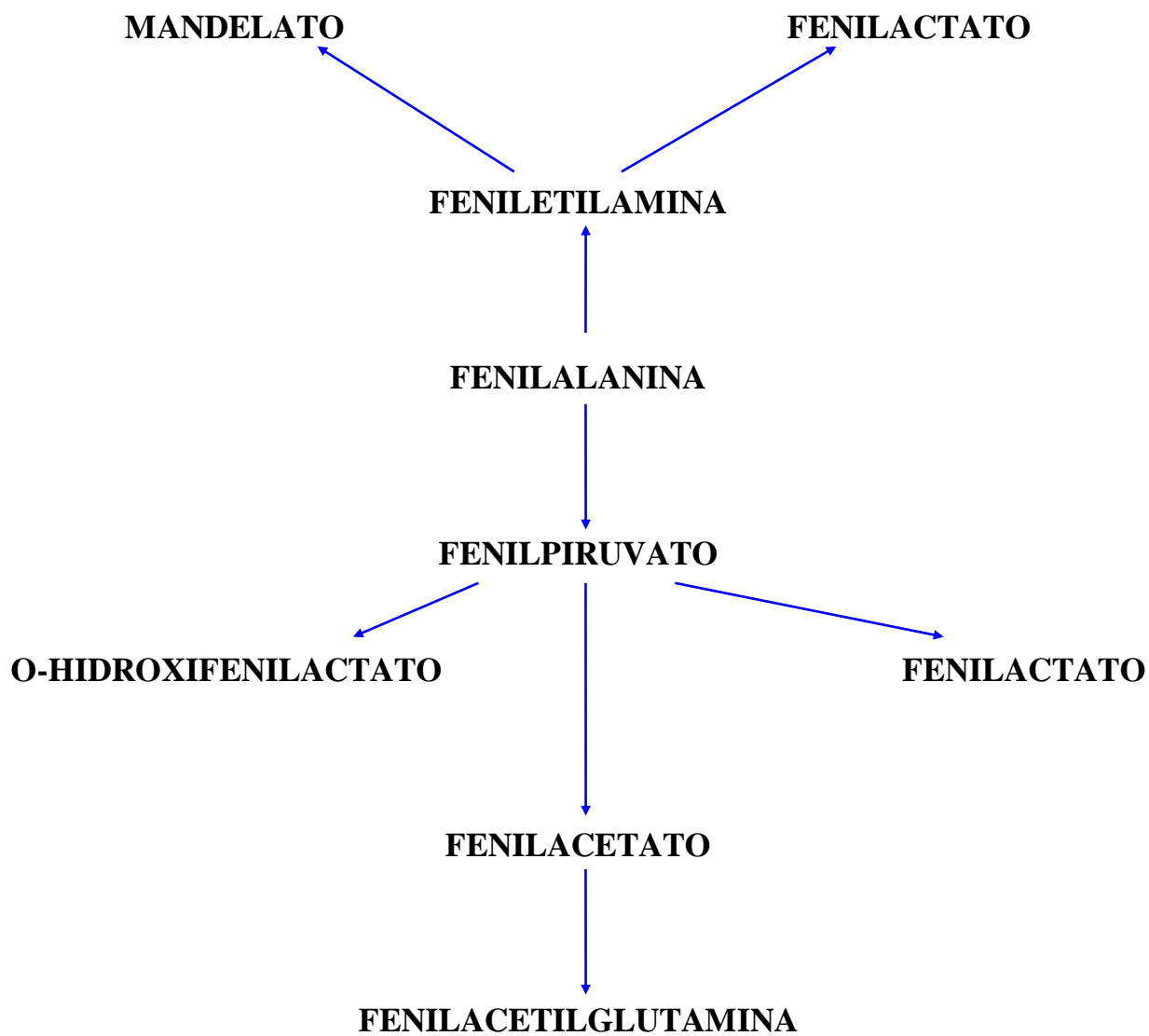


Figura 1.3 - Vias catabólicas secundárias da fenilalanina
(Scriver & Clow, 1980)

1.1.1.4 – Diagnóstico

Crianças com níveis plasmáticos de Phe acima de 20mg/100ml ou 1,2nmol/l e intolerância à Phe são classificadas como fenilcetonúricas clássicas ou com hiperfenilalaninemia maligna. É importante fazer o diagnóstico diferencial dos pacientes com fenilcetonúria clássica ou maligna daqueles com hiperfenilalaninemia benigna ou persistente (níveis plasmáticos de Phe abaixo de 10mg%), bem como identificar os pacientes com variantes por alteração do cofator da fenilalanina hidroxilase (hiperfenilalaninemia atípica) que requerem tratamento específico (Scriver e Clow, 1980; Giugliani et al., 1986).

O diagnóstico pode ser suspeitado através do teste de Guthrie, e confirmado pela determinação fluorimétrica da Phe no soro (Thompson e Tompson, 1988) ou ainda por cromatografia de troca iônica através de analisadores de aminoácidos ou por cromatografia líquida de alta pressão.

1.1.1.5 - Aspectos clínicos

Pacientes fenilcetonúricos não tratados no primeiro mês de idade apresentam um quociente de inteligência (QI) geralmente menor do que 50 (Tourian e Sidbury, 1983).

A fenilcetonúria caracteriza-se clinicamente por um grupo de sinais e sintomas que se manifestam em maior ou menor intensidade: eczema, dificuldade para andar e falar, hipopigmentação da pele, atraso do desenvolvimento psicomotor, convulsões, hiperatividade, comportamento agressivo, hipotonia muscular, tremores, microcefalia, epilepsia, hipoplasia dentária, descalcificação dos ossos longos, retardo do crescimento e anormalidade no eletroencefalograma (EEG) (Jervis, 1937; Fois et al., 1955; Paine, 1957; Poley Jr e Dumermuth, 1968; Nyhan, 1979, Pietz et al., 1993). Uma característica comum na enfermidade é o odor característico de “mofo” que exala da urina.

1.1.1.6 - Aspectos fisiopatológicos

A busca dos mecanismos envolvidos na disfunção cerebral tem impulsionado a associação entre as pesquisas básica e clínica para demonstrar a interação entre as alterações metabólicas que ocorrem na fenilcetonúria e o prejuízo no desenvolvimento cerebral.

A deterioração mental e as alterações do tecido nervoso dos pacientes com fenilcetonúria foram anteriormente relacionadas com possíveis efeitos tóxicos do fenilpiruvato (Silberberg, 1967 e Weber, 1969) e do fenilacetato (Fulton et al., 1980). Trabalhos mais recentes têm imputado à Phe o principal papel na gênese da disfunção cerebral(Scriver)

O transporte de aminoácidos pelo cérebro (Pratt, 1982; Smith, 1991) é feito através da barreira hemato-encefálica de estrutura complexa, localizada na superfície endotelial dos capilares cerebrais através de sistemas de transporte, entre eles o sistema L que transporta aminoácidos precursores de neurotransmissores (triptofano e tirosina), aminoácidos neutros de cadeia longa (treonina, metionina e fenilalanina) e de cadeia ramificada (leucina, valina e isoleucina) (Laterra e Goldstein, 1993). Estes aminoácidos competem entre si ao saturar os sistemas de transporte da barreira hemato-encefálica (Oldendorf, 1973; Wurtman et al., 1980; Smith, 1991). Sendo assim, o aumento dos níveis circulantes de Phe em pacientes fenilcetonúricos limitaria o transporte de tirosina e de triptofano diminuindo sua disponibilidade para a síntese de neuropeptídeos ou conversão a aminas biogênicas (Nadler e Hsia, 1961; Oldendorf, 1973; Padridge e Oldendorf, 1975; Wurtman et al., 1980).

Os níveis liquóricos de Phe foram reduzidos com a administração de aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina e valina) (Berry et al., 1982), porém pouco benefício sobre a performance em testes neuropsicológicos de pacientes fenilcetonúricos foi percebida (Berry et al., 1990). Estes aminoácidos regulam várias funções celulares e estão

elevados na doença do xarope do bordo, que apresenta também retardo mental, sugerindo que a administração prolongada destes aminoácidos poderia causar prejuízos ao SNC.

Estudos feitos com pacientes com fenilcetonúria indicaram alteração na substância branca do cérebro (Shah et al, 1972), menor quantidades de lipídeos associados à mielina (Tourian e Sidbury, 1983), redução de espinhas dendríticas no córtex e retração nas ramificações dendríticas das células piramidais (Bauman e Kemper, 1982) e redução no peso do cérebro (Alvord et al., 1950). Estudos de ressonância magnética em pacientes fenilcetonúricos confirmou muitos dos achados neuropatológicos anteriores (Shaw et al., 1990).

Apesar de não haver unanimidade, alguns trabalhos relataram diminuição da síntese de serotonina (Yuwiler et al., 1965; Wurtman et al., 1980; Loo et al., 1980) e de catecolaminas (Nadler e Hsia, 1961; Mc Kean et al., 1972) em pacientes fenilcetonúricos.

Consideráveis evidências têm demonstrado que, em crianças com PKU, ocorre simultaneamente uma elevação nas concentrações de Phe e uma diminuição de outros aminoácidos essenciais no sangue (Efron et al, 1969; Linnerweh et al, 1960 - citados por Taylor et al, 1983) e tecido cerebral (Mc Kean, 1972). A diminuição da concentração sangüínea parece dever-se ao aprisionamento dos aminoácidos no tecido muscular, por efeito da Phe (Cespedes et al., 1989). A baixa concentração de aminoácidos no cérebro, principalmente aminoácidos neutros de cadeia longa, tem sido atribuída, em parte, à menor disponibilidade destes no sangue (Huether et al, 1983 - citado por Huether et al, 1985). Por outro lado, alguns autores têm demonstrado que elevados níveis de Phe no sangue inibiriam competitivamente a captação dos aminoácidos neutros de cadeia longa pelo cérebro. Appel (1966) sugeriu que o retardo mental associado à fenilcetonúria resulta do comprometimento da síntese protéica no cérebro em desenvolvimento.

1.1.1.7 – Tratamento

-

Uma dieta restrita em Phe previne a deterioração mental quando iniciada logo após o nascimento, indicando que não é a deficiência de PAH hepática, mas o excesso de Phe e/ou de seus metabólitos, presentes durante a infância, que causam o dano cerebral.

Trabalhos recentes recomendam uma dieta restrita em Phe indefinidamente (Levy, 1986; Smith et al., 1990; Cockburn et al., 1993), mantendo os níveis circulantes de Phe abaixo de 0,3 mM.

Alguns pesquisadores não encontraram qualquer deterioração em pacientes após o término da dieta quando a criança atinge a maturidade do desenvolvimento neurológico, aos seis anos de idade aproximadamente (Holtzman et al., 1975; Kang et al., 1970). Uma significativa queda no nível de QI após o término do tratamento foi relatada mais recentemente por outros pesquisadores (Cabalska et al., 1977; Brunener et al., 1983; Holtzman et al., 1986; Thompson et al., 1990).

1.2 - Neurotransmissão, co-transmissão, neuromodulação e apirase

O papel biológico do ATP não é somente fornecer energia para os processos metabólicos, mas também a transmissão da informação (El Moatssim et al., 1992). O ATP tem sido caracterizado, sob várias evidências, como neurotransmissor, co-transmissor e neuromodulador.

A neuromodulação ocorre quando uma substância modifica o processo de neurotransmissão; a co-transmissão, quando duas ou mais substâncias são liberadas juntas no mesmo terminal nervoso, agindo sinergicamente via seus próprios receptores ou ainda quando uma das substâncias pode agir simplesmente modulando a liberação e/ou a ação da outra (Burnstock, 1972).

Para que uma substância seja classificada como neurotransmissor, alguns critérios devem ser preenchidos (Burnstock, 1972):

1. Os terminais nervosos pré-sinápticos devem conter a maquinaria necessária para a síntese, estocagem e regulação da síntese.
2. A substância, após estimulação, deve ser liberada em quantidades suficientes para desencadear uma resposta na célula efetora;
3. Na fenda sináptica deve existir um ou mais mecanismos de inativação apropriado, seja pela degradação enzimática e/ou pela recaptação do mediador.

Em sistema nervoso periférico de mamíferos, o ATP é armazenado e liberado em conjunto com noradrenalina (Geffen e Livett, 1971 e Brizzolara e Burnstock, 1990) e com acetilcolina (Silinski e Hubbard, 1973). Com relação ao sistema nervoso central de mamíferos, vários trabalhos demonstraram a liberação conjunta de ATP e adenosina (Kuroda e McIlwain, 1974; Kuroda, 1978; White, 1978; Lee et al. 1982; Richardson e Brown, 1987; Todorov et al., 1997; Vitolo et al., 1998).

Tem sido proposto que além dos sistemas colinérgico e adrenérgico existe, no sistema nervoso autônomo, a transmissão purinérgica, na qual o ATP é o principal neurotransmissor (Burnstock et al., 1971; Burnstock et al., 1972; Burnstock et al., 1981; Burnstock et al., 1985; Burnstock et alii, 1987; Burnstock et al., 1992; Burnstock et al., 1998). Receptores purinérgicos, que ligam nucleotídeos e nucleosídeos, estão envolvidos nas mais variadas formas de transdução de sinais. São divididos em receptores de adenosina ou P1 (subdivididos em A_1 , A_{2A} , A_{2B} , e A_3) e em receptores P2, que são subdivididos em dois grandes grupos: os receptores ionotrópicos P2X ($P2X_{1-7}$) e os receptores metabotrópicos P2Y ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$ e $P2Y_{11}$). Os receptores P2 ligam preferencialmente ATP e/ou UTP e seus derivados difosfato, tendo uma afinidade muito baixa pelos derivados monofosfato (Ralevic e Burnstock, 1998).

Considerando que o ATP desempenha papéis de neurotransmissor, co-transmissor e neuromodulador, há evidências de que seu comportamento fisiológico na neurotransmissão está relacionado à atividade de uma ecto-ATPase (Zimmermann, 1996), a apirase, que pode hidrolisar diferentes di- e trifosfonucleotídeos como um eficiente mecanismo enzimático de controle de concentração do ATP e dos produtos de sua hidrólise (ADP, AMP e fosfato inorgânico) (Komoszynski e Wojtczak, 1996).

1.3 - ATP - difosfohidrolase (apirase, EC 3.6.1.5) e 5'- nucleotidase (EC 3.1.1.5)

A apirase (nome proposto para uma ATP-difosfohidrolase por Meyerhof em 1945) é um membro da família das ATPases tipo-E que são enzimas dependentes de cálcio ou

magnésio, insensíveis a inibidores específicos das ATPases intracelulares tipo-P, tipo-F e tipo-V e que hidrolizam todos os nucleosídeos tri- e/ou difosfatos, mas não nucleosídeos monofosfatos (Plesner, 1995). Diferentemente das ATPases que possuem alta afinidade pelo substrato hidrolizando ATP a ADP mais ortofosfato, as apirases possuem baixa especificidade pelo substrato e quando hidrolizam ATP, os principais produtos são AMP e dois ortofosfatos. Além disto, enquanto as ATPases utilizam a energia estocada no ATP para processos metabólicos e transporte iônico, as apirases estão envolvidas na neurotransmissão, na agregação plaquetária, regulação da pressão sanguínea, glicosilação de proteínas e controle do nível de glicose, regulação da integridade de membrana (Komoszynski e Wojtczak, 1996) e epilepsia (Nagy, et al, 1990; Wang e Guidotti, 1998), entre outros. Há evidências de que ATPase e ATP-difosfohidrolase coexistam em um mesmo tecido, como por exemplo em estômago de galinha, demonstrando que estas ectonucleotidases são enzimas distintas (Carl et al, 1997).

A razão entre as hidrólises do ATP e a do ADP varia entre um e dois para a maioria das apirases. O pH ótimo para a enzima em plantas é de aproximadamente 6,5 e em animais está acima de 7,0. As apirases são insensíveis a reagentes de grupos -SH e são inibidas por agentes quelantes, azidas e análogos do ATP (Komoszynski e Wojtczak, 1996).

Várias apirases têm sido descritas na literatura em células vegetais (Krishnan, 1949; Valenzuela et al., 1973; Ghosh et al. (1997) e em células animais em vários tecidos de mamíferos: sistema nervoso central e periférico, aorta bovina, células de músculo liso e endotelial, plasma e eritrócito humanos, pâncreas de porco, membrana plasmática, secreções seminal e oviductal, placenta de ratos e de seres humanos, vasos umbilicais humanos, glândula mamária e uterina e pulmão bovino (Sarkis, 1995). A presença das apirases tem sido detectada principalmente por protocolos que excluam outras atividades enzimáticas que poderiam mimetizar a enzima, tais como: adenilatoquinase, ATPases, pirofosfatases inorgânicas e fosfatases inespecíficas (Sarkis et al., 1995; Battastini et al., 1995; Oliveira et al., 1997). O uso de anticorpos é um método que tem sido cada vez mais utilizado para identificar a apirase nos diferentes tecidos (Battastini et al., 1995; Strobel et al., 1996; Wang e Guidotti, 1998; Smith e Kirley, 1999).

Em 1996, Handa e Guidotti purificaram e clonaram a apirase solúvel de batata e mostraram que a seqüência de aminoácidos tinha grande similaridade com o antígeno de ativação celular linfóide CD39. Esta proteína de membrana de 70 a 100 kDa foi descrita primeiramente como uma proteína marcadora de superfície de células B transformadas pelo vírus Epstein Barr (EBV) (Wang e Guidotti, 1996) e está expressa principalmente em células linfóides ativadas (Maliszewski, 1994). O papel fisiológico proposto para a CD 39 nas células imunitárias é o de protegê-las dos efeitos potencialmente líticos do ATP liberado pelas células alvo (Filippini et al., 1990). Seguindo evidências tais como atividades apirásicas serem encontradas sobre linfócitos B transformados por EBV, os quais expressam CD39 como maior marcador de superfície, ou a similaridade da seqüência de aminoácidos da CD39 com várias ecto-ATPases, alguns autores já se referem à apirase como CD39 (Wang et al., 1997; Carl e Kirley, 1997; Kegel et al., 1997; Zimmermann et al., 1998; Gayle III et al., 1998; Smith e Kirley, 1998; Nagy et al., 1998).

A estrutura da apirase foi experimentalmente observada e caracterizada recentemente através da clonagem e seqüenciamento das apirases de cérebro de ratos (Wang et al, 1997) e de seres humanos (Smith e Kirley, 1998). A apirase de cérebro de rato é composta por 511 aminoácidos com um PI calculado de 7.44 (Kegel et al., 1997), possuindo duas regiões hidrofóbicas localizadas próximo aos domínios amino e carboxiterminal, os quais são longos o suficiente para atravessar a membrana; seis sítios potenciais de N-glicosilação, localizados na região extracelular e dez resíduos de cisteína conservados na região entre os dois domínios transmembrana, sugerindo a existência de ligações dissulfeto extracelular (Wang et al., 1997).

A existência de quatro regiões conservadas foi observada através da análise da seqüência de diversas apirases (Handa e Guidotti, 1996). Estas regiões foram chamadas de ACR (apyrase conserved regions) e consistem em ACR I a IV. Considerando que outras proteínas que hidrolisam tri- e difosfato também as possuem, foi proposto o seu envolvimento no sítio catalítico da enzima. Recentemente Smith e Kirley, (1999) demonstraram que a mutação de um resíduo de ácido aspártico das regiões conservadas ACRI e IV reduziram a atividade hidrolítica da apirase em mais de 90%, reforçando os

achados de similaridade entre estas duas regiões e os domínios de ligação de fosfato β e γ da actina-hsp 70 hexoquinase (Handa e Guidotti, 1996, Nagy et al., 1998).

Em conjunto com outra ecto-nucleotidase, a 5'-nucleotidase, a apirase forma uma cadeia enzimática capaz de promover a hidrólise completa do ATP extracelular até adenosina (Battastini et al., 1991; Battastini et al., 1995). As vias de degradação dos nucleotídeos no espaço sináptico durante o processo de neurotransmissão estão representadas na figura 1.4. A 5'-nucleotidase está bem caracterizada em SNC e SNP (Cammer et al., 1980; Heymann et al., 1984; Grondal e Zimmermann, 1986 e 1987). É ancorada à membrana por GPI (glicosil-fosfoinositol), fazendo com que a enzima seja liberada facilmente da membrana por fosfolipase C específica para grupos fosfatidil (PI-PLC) (Zimmermann, 1998). Já a ecto-ATPase e a apirase são profundamente associadas à bi-camada lipídica, apresentando várias características de proteínas integrais de membrana (Battastini et al., 1998). A atividade catalítica e topografia de membrana das ectonucleotidases estão representadas da figura 1.5.

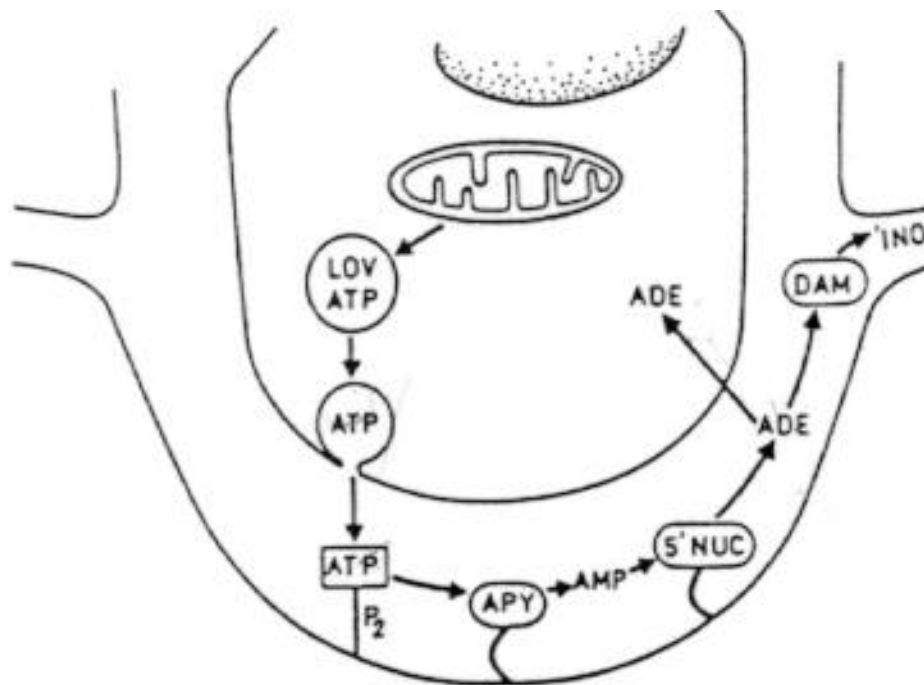


Figura 1.4 - Vias de degradação dos nucleotídeos na fenda sináptica durante o processo de neurotransmissão. (Komoszynski & Wojtczak, 1996).

A hidrólise do ATP ligado ao receptor, catalisada pela apirase, libera o receptor P2 e AMP. Posteriormente, a 5'-nucleotidase hidrolisa o AMP formado, produzindo adenosina. Adenosina, por sua vez, pode penetrar à célula, onde é fosforilada, restaurando o “pool” intracelular de ATP. A adenosina pode ainda ser degradada à inosina pela adenina deaminase.

Abreviaturas: P2 (purinoceptor), APY (apirase), 5'NUC (5'-nucleotidase), ADE (adenosina), DAM (adenina deaminase), INO (inosina), LOV ATP (vesículas densas).

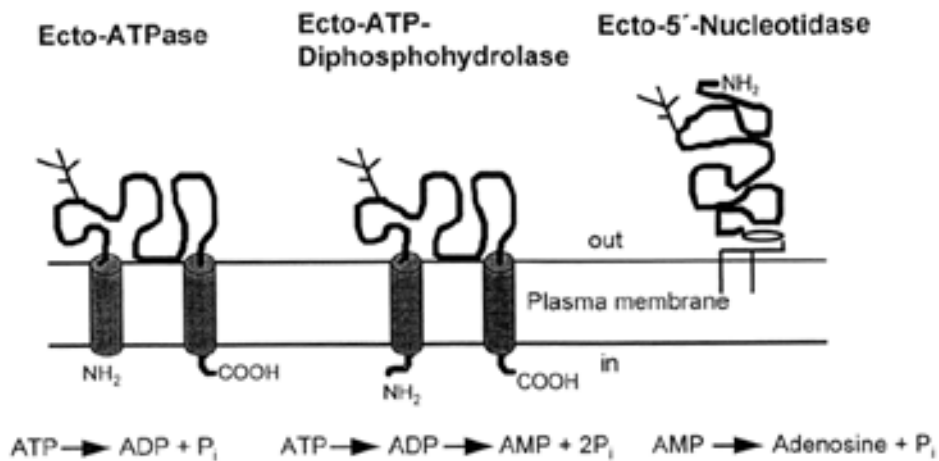


Figura 1.5 - Atividade catalítica e topografia de membrana de ecto-nucleotidasas.

(Zimmermann et al, 1998).

As ecto-ATPases e as ecto-APirases são relacionadas filogeneticamente. A ecto-ATPase não possui o segmento intracelular amino terminal. A 5'-nucleotidase é ancorada à membrana via âncora de GPI.

A existência de mecanismos de regulação da atividade apirásica parece ser fundamental para o controle da transmissão purinérgica. A apirase, ao degradar ATP e

ADP a AMP, e a 5'-nucleotidase, ao hidrolisar AMP a adenosina, realizam passos fundamentais para a regulação da concentração relativa dos nucleotídeos e nucleosídeos no meio extracelular, regulando assim a intensidade de seu efeito sobre os receptores purinérgicos. Receptores P1 podem estimular ou inibir a produção de AMPc (dependendo do subtipo), estimular a produção de IP₃, aumentar a permeabilidade de K⁺ e diminuir a concentração de cálcio interno ([Ca²⁺]_i). Os receptores P2X mediam uma passagem rápida e não seletiva dos íons Na⁺, K⁺ e Ca²⁺ pela membrana celular, despolarizando a célula e levando a um aumento na [Ca²⁺]_i. Os receptores P2Y, da mesma forma como os receptores P1, são acoplados à proteína G e podem estimular ou inibir a produção de AMPc (dependendo do subtipo), estimular a produção de IP₃, estimular a MAPK (Proteína Quinase Associada aos Microtúbulos) entre outros (Ravelic e Burnstock, 1998; Neary et al., 1994).

Considerando que os nucleotídeos de adenina podem ativar receptores purinérgicos P2 e que os produtos de degradação podem ativar os receptores P1, esta regulação coloca as ecto-nucleotidases e os transportadores de adenosina em uma posição central durante o processo de neurotransmissão na fenda sináptica (Wink, 1999).

Estudos anteriores realizados em nossos laboratórios sobre os efeitos da Phe e de seus metabólitos sobre a atividade da ATP-difosfohidrolase demonstraram que a Phe e o fenilpiruvato (PP) alteram as atividades de hidrólise do ATP e do ADP (Wyse, 1990). A Phe alterou esta atividade com inibição máxima na concentração de 2,0 mM e com ativação máxima na concentração de 5,0 mM, enquanto o PP alterou as atividades de hidrólise da apirase com inibição máxima na concentração de 2,0 mM e ativação máxima na concentração de 5,0 mM. Estes resultados sugerem que as alterações da atividade da ATP-difosfohidrolase em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos provocadas por Phe e PP possam estar envolvidas na gênese da deficiência mental observada em ratos submetidos à PKU experimental, indicando a necessidade de investigar esta enzima em tecido nervoso de crianças afetadas por PKU e o efeito de Phe e PP sobre a apirase.

O efeito da Phe e de seus metabólitos também foi estudado sobre a atividade da Na⁺K⁺-ATPase, enzima envolvida na manutenção do potencial de membrana e na integridade celular no cérebro. Observou-se que ela é inibida “*in vitro*” pela Phe e seus

metabólitos e que esta inibição é revertida pela alanina. Por outro lado, a alanina não altera a atividade da enzima quando testada isoladamente, mas quando testada com Phe e fenilactato, ela compete pelo mesmo sítio ativo da enzima (Wyse, 1995; Wyse et al 1998). Foi verificado ainda que a administração de Ala previne a diminuição da atividade da Na^+K^+ -ATPase induzida pela fenilcetonúria experimental em ratos (Wyse et al, 1999). A Ala também mostrou-se capaz de impedir o efeito inibitório da Phe sobre a fosforilação in vitro de proteínas do citoesqueleto de córtex cerebral de ratos (Carreras, 1999). Em estudos realizados com ratos submetidos ao modelo químico de fenilcetonúria, Pedron (1992) observou que a administração de alanina impede a redução do peso cortical cerebral sem impedir a instalação das alterações comportamentais. Estas observações sugerem que a Ala poderia eventualmente reverter também o efeito inibitório da Phe sobre a ATP-difosfohidrolase.

2. OBJETIVOS

2.1 - Determinar os efeitos da fenilalanina e do fenilpiruvato sobre as atividades da ATP-difosfoidrolase e da 5'-nucleotidase em fração sinaptossomal de córtex cerebral de ratos.

2.2 - Determinar o tipo de inibição causada por fenilalanina e por fenilpiruvato sobre a atividade da ATP-difosfoidrolase em fração sinaptossomal de córtex cerebral de ratos.

2.3 - Determinar a interação entre fenilalanina e fenilpiruvato na inibição da ATP-difosfoidrolase em fração sinaptossomal de córtex cerebral de ratos.

2.4 - Verificar o efeito ' *in vitro* ' da alanina sobre as atividades da ATP-difosfoidrolase e da 5'-nucleotidase em fração sinaptossomal de córtex cerebral de ratos.

2.5 - Verificar o efeito da alanina sobre a inibição causada pela fenilalanina e pelo fenilpiruvato sobre a atividade da ATP-difosfoidrolase em fração sinaptossomal de córtex cerebral de ratos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1 – Reagentes químicos

Nucleotídeos (ADP, AMP), HEPES, Trizma Base e EDTA foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO, USA). Sacarose, CaCl₂, e KCl foram obtidos da Merck (Darmsdat, FRG). Percoll foi adquirido da Pharmacia (Uppsala, Sweden) e foi rotineiramente filtrado através do Millipore AP15 para remover agregados. Todos os demais reagentes utilizados possuíam grau de pureza analítico.

3.1.2 - Animais

Ratos Wistar provenientes do biotério do Departamento de Bioquímica - ICBS da UFRGS, criados em número de oito por gaiola, desmamados aos vinte e um dias, com alimentação padrão e ciclos de 12 horas claro-escuro em salas climatizadas (20°C ± 1°C).

3.2 - Preparação sinaptossomal

A fração sinaptossomal de córtex cerebral de ratos foi extraída conforme descrito por Nagy e Delgado-Escueta (1984).

3.3 - Análise enzimática

A atividade enzimática foi medida de acordo com o método descrito por Battastini et al. (1995).

A integridade dos sinaptossomas foi avaliada através da medida da lactato desidrogenase pelo método descrito por Whittaker (1969).

O fosfato inorgânico liberado foi medido pelo método de Chan et al. (1986). Os resultados foram expressos em nmol de Pi / min . mg proteína .

3.4 - Determinação das proteínas

A determinação da proteína foi realizada pelo método de Bradford (1976).

3.5 - Caracterização da inibição enzimática

As inibições enzimáticas foram caracterizadas de acordo com os métodos de Lineweaver-Burk e a interação pelo método de Chevillard et al. (1993), adaptado por Wyse et al.(1997).

3.6 - Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância de uma via, seguida do teste do raio múltiplo de Duncan quando o valor de F foi significativo, através do programa SPSS/PC Copyright SPSS Inc. 1984, 1985, 1986 (Statistical Package for Social Sciences), sendo os resultados apresentados como média \pm desvio padrão.

Nota: Maiores detalhes referentes a material e métodos estão relatados no artigo encaminhado à publicação que se encontra em anexo.

4. RESULTADOS

Os resultados apresentados estão divididos em duas partes:

Parte I - Resultados que compõem o artigo submetido à publicação, anexo a seguir.

Parte II - Resultados que não constam no artigo.

4.1 - Artigo submetido à publicação.

(Anexo a seguir).

EFFECTS OF PHENYLALANINE AND PHENYLPYRUVATE ON ATP-DIPHOSPHOHYDROLASE (EC 3.6.1.5) AND 5'-NUCLEOTIDASE (EC 3.1.3.5) ACTIVITIES IN SYNAPTOSOMES FROM CEREBRAL CORTEX OF RATS.

Simone Luisa Berti, Carla Denise Bonan, Flávio Laporta da Silva, Ana Maria Oliveira Battastini, João José Freitas Sarkis, Clóvis Milton Duval Wannmacher *

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Number of pages (including figures): 20

Number of figures: 4

* Corresponding author: Dr. Clóvis Milton Duval Wannmacher

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-anexo, 90035 - 003 Porto Alegre - RS, Brasil. Phone: 5551 - 3165575 Fax: 5551 - 3165535

E-mail: clovisdw@vortex.ufrgs.br

ACKNOWLEDGEMENTS - This work was supported by grants from Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP-Brazil), Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX, Brazil).

S.L.B. was the recipient of a CNPq-Brazil fellowship.

Abstract

We have previously demonstrated that 2.0 mM Phe or 5.0 mM PP, a deaminated Phe metabolite, reduce ATP-diphosphohydrolase activity in synaptosomes from cerebral cortex of rats. The main objective of the present study was to characterize the inhibition by Phe or PP of ATP-diphosphohydrolase activity. Since ATP-diphosphohydrolase participates with 5'-nucleotidase in adenosine synthesis from ATP and ADP, we determined the *in vitro* effects of Phe or PP on 5'-nucleotidase activity in the same fraction. Synaptosomes were prepared from brain cortex of rats aged 25-35 days for the determination of ATP-diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities. Phenylalanine or phenylpyruvate inhibited ATP-diphosphohydrolase by approximately 20%, whereas 5'-nucleotidase activity was not affected by the two metabolites. The results of the kinetic studies performed with ATP-diphosphohydrolase suggest that ADP may enhance, and phenylalanine or phenylpyruvate may decrease, the enzyme activity by acting at the same binding site. Considering the importance of ATP-diphosphohydrolase activity for the degradation of the neurotransmitter ATP in the central nervous system, if the effects observed *in vitro* also occurs *in vivo*, the enzyme inhibition may be one of the mechanisms leading to the brain damage characteristic of phenylketonuria.

Classification Terms:

Theme J: Disorders of the nervous system

Topic: Developmental disorders

Keywords: ATP-diphosphohydrolase, apyrase, 5'-nucleotidase, phenylketonuria, phenylalanine, phenylpyruvate.

1. Introduction

Phenylketonuria (PKU) is an inherited deficiency of phenylalanine hydroxylase activity in liver, which leads to increased serum and brain levels of phenylalanine (Phe) and its deaminated metabolites. The most crucial effect, i.e. permanent brain damage, occurs during the early period of postnatal brain development and may be related to improper neuron differentiation and synaptogenesis [26]. Other known pathological events associated with hyperphenylalaninemia (HPA) are the loss of myelin due to an increase of its turnover, disintegration of the myelin sheath [14], and reduction of synaptic terminals [19]. Many aspects of synaptogenesis are mediated by cell-cell and cell-extracellular matrix interactions [26]. The mechanisms underlying brain damage are possibly multiple and not fully understood.

ATP is known to exert potent effects on the central nervous system, where it can act as a neurotransmitter or as a modulator regulating the activity of other neurotransmitters [20, 24]. ATP released from synaptosomes must be metabolized to adenosine, this being the principal form of nucleoside re-uptake and neuromodulation [21]. Extracellular adenine nucleotides are subject to degradation by ectonucleotidases and can generate adenosine in the synaptic cleft [1]. Thus, these enzymes which promote the extracellular hydrolysis of nucleotides may represent a mechanism for the control of nucleotide/nucleoside concentration and consequently of the duration and extent of cell-to-cell receptor activation .

ATP-diphosphohydrolase (ATPDase, apyrase, EC 3.6.1.5) is a general designation for enzymes that hydrolyse triphospho and diphosphonucleosides to their equivalent monophosphonucleosides and inorganic phosphate [17]. The physiological role proposed

for ATP-diphosphohydrolase in the peripheral and central nervous systems [24] is its participation together with 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) in an "enzyme chain" hydrolyzing ATP and ADP to adenosine [1, 12, 23, 27]. The adenosine thus formed can act on P1-purinoceptors and is rapidly taken up via high-affinity uptake systems that are present in neurons and mediate the salvage of physiological purines for incorporation into cellular nucleotides [6,29].

We have previously demonstrated that 2 mM Phe or 5 mM phenylpyruvate (PP), a deaminated Phe metabolite, reduces ATP-diphosphohydrolase activity in synaptosomes from cerebral cortex of rats [28]. The main objective of the present study was to characterize in synaptosomes from cerebral cortex of rats the inhibition by Phe or PP of ATP-diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase, enzymes involved in ATP-to-adenosine degradation in the synaptic cleft.

2. Material and methods

Material

Nucleotides (ADP, AMP), HEPES, Trizma Base and EDTA were obtained from Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO, USA). Sucrose, CaCl₂, and KCl were obtained from Merck (Darmsdat, FRG). Percoll was purchased from Pharmacia (Uppsala, Sweden) and was routinely filtered through Millipore AP15 pre-filters to remove aggregated, and incompletely coated particles. All other reagents used were of analytical grade.

Animals

Wistar rats from our own breeding stock were maintained on a 12-h light/12-h dark cycle (lights on at 7 a.m.) in an air-conditioned constant temperature ($20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$) colony room. Pups in litters that averaged eight in number remained with the dam, unless otherwise indicated, until weaning at 21 days of age. The rats were killed between 25 and 35 days of age.

Synaptosomal Preparation.

The animals were killed by decapitation and the brains were rapidly removed. After removal, the brains were placed into an ice-cold isolation medium (0.32 M sucrose, 5.0 mM HEPES, pH 7.5, and 0.1 mM EDTA) and the cerebral cortex was immediately dissected on ice. The cerebral cortex was gently homogenized in 10 volumes of ice-cold medium with a motor-driven Teflon-glass homogenizer. After centrifugation at $1,000 \times g$, the supernatant was used for synaptosomal preparation. The synaptosomes were isolated as described previously [19]. Briefly, 0.5 ml of the crude mitochondrial fraction was suspended in 4.0 mL of an 8.5% Percoll solution by gentle hand homogenization in a small-volume Teflon-glass homogenizer and the suspension was layered onto an isoosmotic Percoll/sucrose discontinuous gradient (10/16%). The synaptosomes that banded at the 10/16% Percoll interface were collected with wide tip disposable plastic transfer pipettes. The synaptosomal fraction was washed twice at $15,000 \times g$ for 20 min with the same ice-cold medium described above to remove the contaminating Percoll and the synaptosome pellet was resuspended to a final protein concentration of approximately 0.5 mg/ mL. The material was prepared fresh daily and maintained at $0-4^{\circ}\text{C}$ throughout preparation.

Enzyme Assays

The reaction medium used to assay ecto-ATP-diphosphohydrolase activity was essentially as described previously [1] and contained 5.0 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 0.1 mM EDTA, 10 mM glucose, 225 mM sucrose, and 45 mM TRIS-HCl buffer, pH 8.0, in a final volume of 200 μ L. The concentration of Phe used in the assay was in the range 0.5-3.0 mM range and the concentration of PP was in the range 5.0 -10.0 mM range. The enzyme preparation (10-20 μ g protein) was added to the reaction mixture and preincubated for 10 minutes at 37°C. The reaction was started by the addition of ADP (vanadium-free sodium salt) to a final concentration of 1.0 mM and stopped by the addition of 200 μ L of 10% trichloroacetic acid. The samples were chilled on ice for 10 minutes and 100 μ L samples were taken for the assay of released inorganic phosphate (Pi) [7].

The reaction medium used to assay ecto 5'-nucleotidase activity contained 10 mM MgCl₂, 0.1 M TRIS-HCl, pH 7.0 and 0.15 M sucrose in a final volume of 200 μ L [14]. The concentrations of Phe or PP were the same as used in the assay of ATP-diphosphohydrolase. The enzyme preparation (10-20 μ g protein) was preincubated for 10 minutes at 37°C. The reaction was started by the addition of AMP (vanadium-free sodium salt) to a final concentration of 1.0 mM and stopped by the addition of 200 μ L of 10% trichloroacetic acid. The samples were chilled on ice for 10 minutes and 100 μ L samples were taken for the assay of released inorganic phosphate (Pi) [7]. In both enzyme assays, incubation time and protein concentration were chosen in order to

ensure the linearity of the reactions. Controls with the addition of the enzyme preparation after the addition of trichloroacetic acid were used to correct for nonenzymatic hydrolysis of the substrates. All samples were run in duplicate.

Protein Determination

Protein was measured by the Coomassie Blue method [5] using bovine serum albumin as standard.

Characterization of Enzyme Inhibition

The inhibition type was characterized by the Lineweaver-Burk plot and the interaction between inhibitors by the Chevillard plot [9].

Statistical Analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by the Duncan multiple range test when F was significant. All analyses were performed with an IBM compatible computer using the SPSSPC software.

3. Results

The activity of synaptosomal ATP-diphosphohydrolase from rat cerebral cortex was 72.23 ± 14.37 nmol Pi per min per mg protein for ADP hydrolysis. These values are similar to those obtained previously [1, 18].

The effects of Phe or PP on ATP-diphosphohydrolase activity are shown in Fig. 1A and 1B respectively. Phe significantly inhibited ADP hydrolysis by 10-20% ($F_{(6,21)} = 2.715$; $p < 0.05$), with maximal inhibition occurring at 1.5 mM concentration. PP also significantly inhibited the enzyme activity by 10-20% ($F_{(3,8)} = 12.31$; $p < 0.01$). Maximal

inhibition by PP (20%) was attained at 5 mM concentration. These results are similar to those obtained previously [28].

The Lineweaver-Burk double-reciprocal plot was analyzed over a range of ADP concentrations (0.1 to 0.25 mM) in the absence and presence of Phe (0.75 to 1.5 mM) or PP (4.25 to 4.75 mM). The results indicate that the inhibition of ADP hydrolysis by Phe or by PP in synaptosomes from the cerebral cortex is competitive (Fig. 2 A and 2B).

To determine whether or not the inhibition caused by Phe and PP occur at the same site of the enzyme, we performed kinetic studies on the interaction between the two compounds in terms of their inhibitory action on ATP-diphosphohydrolase, according to the adaptation by Wyse et al.[30] of the model described by Chevillard et al. [9]. The horizontal straight line obtained in the resulting competition plot, i.e., a constant rate independent of the proportion between Phe and PP concentration, indicates that the inhibitory activities occur at a common site of the enzyme (Fig. 3).

The activity of 5'-nucleotidase in synaptosomes from rat cerebral cortex was 9.42 ± 0.92 nmol Pi per min per mg protein for AMP hydrolysis. The enzyme activity was not significantly affected by Phe ($F_{(6,21)} = 0.048$; $p > 0.05$) or PP ($F_{(3,12)} = 0.177$; $p > 0.05$) (Fig. 4A and 4B).

4. Discussion

The extracellular hydrolysis of nucleotides is not only of functional importance during synaptic transmission, where it functions in signal elimination, but also plays a

crucial role in the survival and differentiation of neuronal cells *in vitro* and presumably during neuronal development *in vivo* [29].

Efficient control of synaptic transmission requires a mechanism for terminating the actions of neurotransmitters. Because ATP is hydrolyzed to adenosine by membrane-bound enzymes (ectonucleotidases), it has been assumed that these enzymes terminate the neurotransmitter actions of ATP in the synaptic cleft [25]. The rapid breakdown of ATP (and ADP) also acts to reduce the extracellular concentration of these nucleotides within the vicinity of P₂ purinergic receptors that mediate the various biological responses to ATP and ADP [16]. The activity of ATP-diphosphohydrolase results in hydrolysis of these nucleotides to AMP, which is further degraded to adenosine by the action of a 5' nucleotidase [22]. Synaptosomal ATP-diphosphohydrolase activity from rat brain is reduced by heavy-metal compounds, such as aluminum [24], known to be neurotoxic, and by THA, a drug proposed for the treatment of Alzheimer's disease [3]. Suramin, a P₂-purinoceptor antagonist, reduced apyrase activity in hippocampal synaptosomes and the retention of inhibitory avoidance learning [4].

The importance of ATP and ADP hydrolysis in the regulation of hemostasis has been proposed by several authors. In hypoxia, the breakdown of circulating ATP and ADP to adenosine is a protective action assuring a sufficient supply of blood to vital regions of the body, such as cerebral tissue, by prolonged vasodilatation. By converting ADP released from aggregated platelets and/or hemolyzed red blood cells to AMP, the enzyme may play an important role in the prevention of microthrombus formation in brain vessels [11].

In the present study we showed that Phe and PP significantly inhibited the ATP-diphosphohydrolase activity of synaptosomes from the cerebral cortex of rats *in vitro*. On the other hand, Phe and PP did not alter significantly the 5'-nucleotidase activity in the same fraction. We have previously demonstrated that Phe and its deaminated metabolite PP have opposite effects on ATP-diphosphohydrolase activity: at low concentrations (1-3 mM) Phe inhibits the enzyme activity whereas PP stimulates it; at higher concentrations (4-6 mM), Phe stimulates and PP inhibits the enzyme activity. We have postulated that the enzyme has two binding sites, one for Phe and one for PP, with different affinities for the two metabolites, one stimulating and the other inhibiting the enzyme activity [28].

In the present study we investigated the mechanism of enzyme inhibition by Phe or PP. The results obtained with the Chevillard plot showed that the two substances act at the same site and the Lineweaver-Burk plot suggests that the site is the active one. However, the maximum inhibition achieved was approximately 20% for each substance, and their competition with the substrate (ADP) occurred only within a narrow concentration range, being reversed at higher concentrations of each substance [28], a fact difficult to explain by a simple competition for the active site. We are postulating the existence of a binding site for ADP, Phe and PP, where ADP acts by enhancing and Phe or PP acts by decreasing the enzyme activity. Our results indicate that Phe and PP are inhibitors of only one of the two enzymes in the enzymatic chain involved in the complete hydrolysis of ATP to adenosine in the synaptic cleft. However, it is possible to speculate that the 20% decrease in ATP-diphosphohydrolase activity may provide less AMP to 5'-nucleotidase and may thus reduce the ATP cleavage and adenosine formation to some extent. The enhancement of ATP in the synaptic cleft may promote a dramatic increase in intracellular calcium levels

mediated by P2X receptors which may represent a significant damage similar to that induced by excess glutamate [10].

The mechanisms of brain damage in PKU seem to be multiple and are poorly understood. There are many lines of evidence that phenylalanine is the main factor affecting every phase of brain development, but the role of Phe metabolites remains obscure [26]. It has been suggested that Phe interferes with the selective stabilization of developing synapses [2, 8, 15, 19]. The present data indicate that Phe inhibits the enzyme activity at concentrations usually found in plasma and spinal fluid of PKU patients (1-3 mM). However, plasma and spinal fluid PP levels in PKU patients are much lower (less than 1 mM) than the concentrations necessary to reduce ATP-diphosphohydrolase activity (4-6 mM). Considering the importance of ATP-diphosphohydrolase in the nervous system, it is possible that the inhibition of this enzyme, at least by Phe, may be one of the mechanisms leading to the neurological dysfunction found in PKU patients.

References

1. A.M.O. Battastini, J.B.T. Rocha, C.K Barcellos, R.D. Dias, J.J.F. Sarkis, Characterization of an ATP-diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem. Res.* 16 (1991) 1303-1310.
2. M.L. Bauman, T. L. Kemper, Morphologic and histoanatomic observations of the brain in untreated human phenylketonuria. *Acta Neuropath.* 58 (1982) 55-63.
3. C.D. Bonan, A.M.O. Battastini, M.R. Schetinger, C.M. Moreira, S.S. Frasseto, R.D., Dias, J.J.F. Sarkis, Effects of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (THA) on ATP-diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) and 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) from rat brain synaptosomes. *Gen. Pharmac.* 28 (1997) 761-766.
4. C.D. Bonan, R., Roesler, J. Quevedo, A.M.O. Battastini, I. Izquierdo, J.J.F. Sarkis, Effects of suramin on hippocampal apyrase activity and inhibitory avoidance learning of rats. *Pharmacol. Biochem. Behavior.* 63 (1999) 153-158.
5. M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 218-254.
6. G., Burnstock, Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 24 (1972) 509-581.
7. K. Chan, D. Delfert, K.D. Junger, A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157 (1986) 375-380.
8. J.P. Changeux, A. Dauchin, Selective stabilization of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal network. *Nature.* 264 (1976) 705-712.

9. C. Chevillard, M.L. Cárdenas, A. Cornish-Bowden, The competition plot: a sample test of whether two relations occur at the same active site. *Biochem. J.* 289 (1993) 599-604.
10. F.A. Edwards, A.J. Gibb, D. Colquhoun, ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature.* 359 (1992) 144-147.
11. S.S. Frasseto, R.D. Dias, J.J.F. Sarkis, Characterization of an ATP-diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in rat blood platelets. *Mol. Cell. Biochem.* 129 (1993) 47-55.
12. L. Garcia, L. Chayet, A.M. Kettlun, L. Collados, M. Chiong, A. Traverso-Cori, M. Mancilla, M.A. Valenzuela, Kinetic characteristics of nucleoside mono-, di- and triphosphatase activities of the periplasmic 5'-nucleotidase of *Escherichia coli*. *Comp. Biochem. Physiol.* 117B (1997) 135-142.
13. D. Heymann, M. Reddington, G.W. Kreutzberg, Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. *J. Neurochem.* 43 (1984) 971-978.
14. F.A. Hommes, On the mechanism of permanent brain dysfunction in hyperphenylalaninemia. *Biochem. Med. Met. Biol.* 46 (1991) 277-287.
15. F.A. Hommes, K. Matsuo, On a possible mechanism of abnormal brain development in experimental hyperphenylalaninemia. *Neurochem. Int.* 11 (1987) 1-10.
16. T. Kobayashi, T. Okada, E.G. Saz, H. Seguchi, Internalization of ecto-ATPase activity in human neutrophils upon stimulation with phorbol ester or formyl peptide. *Histochem. Cell Biol.* 107 (1997) 353-363.
17. O. Meyerhof, The origin of the reaction of Harden and Young in cell-free alcoholic fermentation. *J. Biol. Chem.* 157 (1945) 105-109.

18. J. Muller, J.B.T. Rocha, A.M.O. Battastini, J.J.F. Sarkis, R.D. Dias, Postnatal development of ATPase-ADPase activities in synaptosomal fraction from cerebral cortex of rats. *Neurochem. Int.* 23 (1993) 471-477.
19. M.P. Nigan, D.R. Labor, The effect of hyperphenylalaninemia on size and density of synapses in rat neocortex. *Brain Res.* 179 (1979) 195-198.
20. J.W. Phillis, P.H. Wu, The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Prog. Neurobiol.* 16 (1981) 187-239.
21. P.J. Richardson, S.J. Brown, ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals. *J. Neurochem.* 48 (1987) 622 - 630.
22. S.C. Robson, E. Kaczmarek, J.B. Siegel, D. Candinas, K. Koziak, M. Millan, W.W. Hancock, F.H. Bach, Loss of ATP-diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation. *J.Exp.Med.* 185 (1997) 153-163.
23. J.J.F. Sarkis, C. Salto', Characterization of a synaptosomal ATP-diphosphohydrolase from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Brain Res. Bull.* 26 (1991) 871-876.
24. M.R. Schetinger, A.T.S. Wyse, L.B. Silva, C.K. Barcellos, R.D. Dias, J.J.F. Sarkis, Effects of aluminum chloride on the kinetics of rat cortex synaptosomal ATP-diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) *Biol. Trac. Elem. Res.* 50 (1995) 209-220.
25. L.D. Todorov, S.M. Todorova, T.D. Westfall, P. Sneddon, C. Kennedy, R.A. Bjur, D. P. Westfall, Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. *Nature.* 387 (1997) 76-79.
26. G.A. Ushakova, H.A. Gubkina, V.A. Kachur, E.A. Lepekhin, Effect of experimental hyperphenylalaninemia on the postnatal rat brain. *Int. J. Devl. Neuroscience.* 15 (1997) 29-36.

27. T.-F. Wang, P.A. Rosenberg, G. Guidotti, Characterization of brain ecto-apyrase: Evidence for only ecto-apyrase (CD39) gene. *Mol. Brain Res.* 47 (1997) 295-302.
28. A.T.S. Wyse, J.J.F. Sarkis, J.S. Cunha-Filho, M.V. Teixeira, M.R. Schetinger, M. Wajner, C.M.D. Wannmacher, Effect of phenylalanine and its metabolites on ATP-diphosphohydrolase activity in synaptosomes from rat cerebral cortex. *Neurochem. Res.* 19 (1994) 1175-1180.
29. H. Zimmermann, Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 49 (1996) 589-618.
30. A.T.S. Wyse, M. Wajner, C.M.D. Wannmacher, Kinetics of alanine reversal on the inhibition of Na^+, K^+ -ATPase activity by phenylalanine and phenyllactate in the synaptic plasma membranes from cerebral cortex of rats. *Med. Sci. Res.* 26 (1998) 141-143.

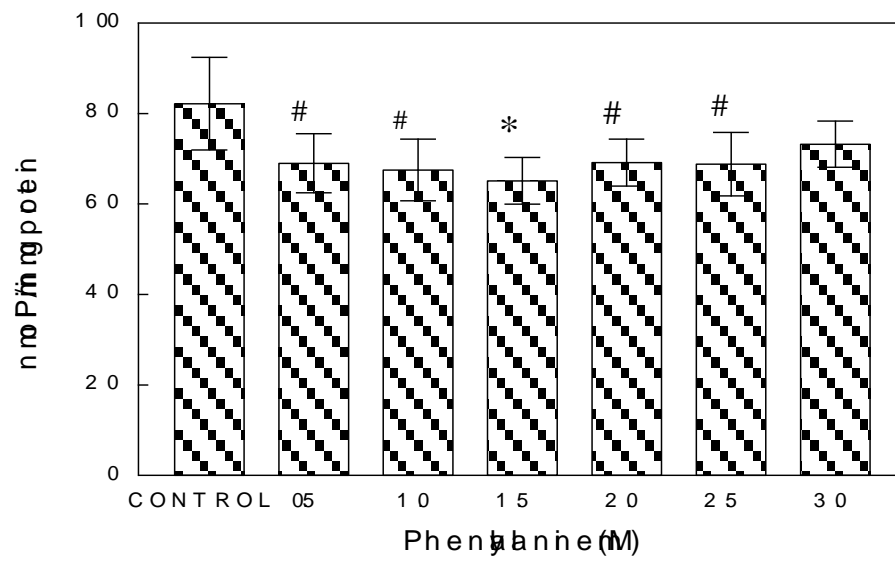
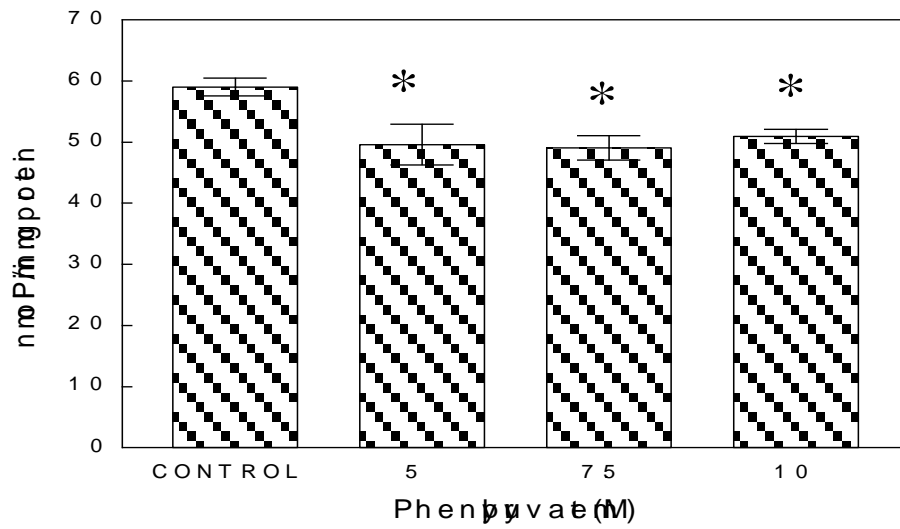
Figure Legends

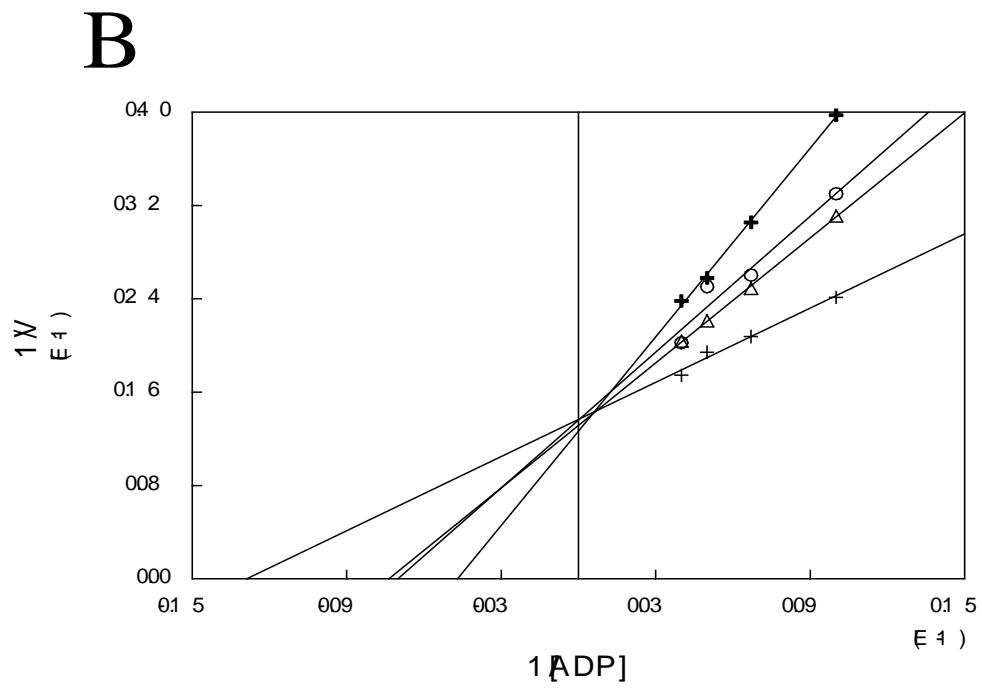
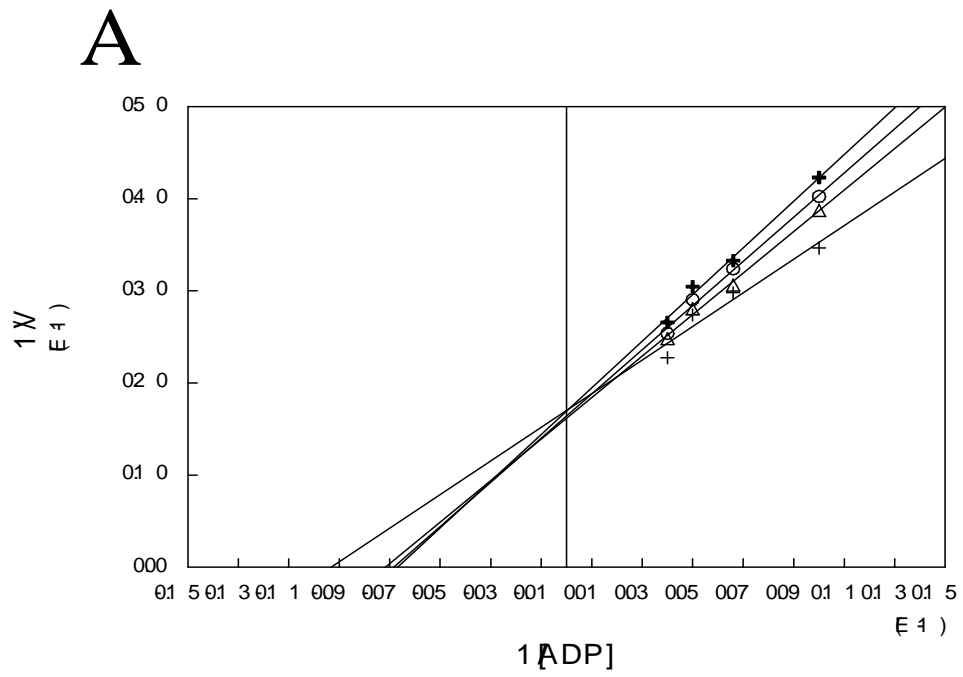
Fig. 1 : Effect of phenylalanine (A) or phenylpyruvate (B) on ATP-diphosphohydrolase activity in synaptosomes from cerebral cortex of rats. Data are mean \pm SD for 3-4 independent experiments performed in duplicate. # $p < 0.05$; * $p < 0.01$ different from control (Duncan multiple range test).

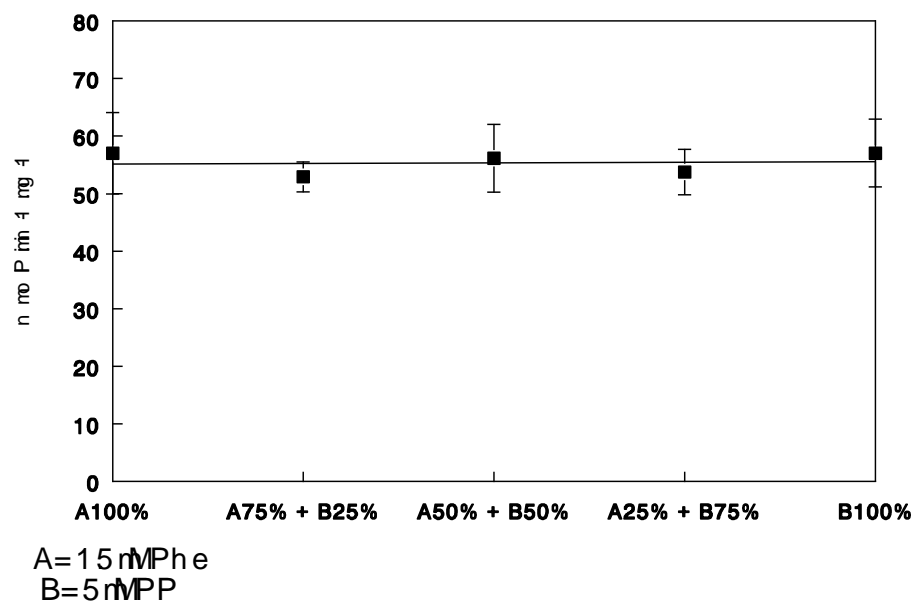
Fig. 2 : Kinetic analysis of the inhibition of apyrase by Phe (A) (+ Control; Δ Phe 0.75mM; \circ Phe 1.0mM; + Phe 1.5mM) and PP (B) (+ Control; Δ PP 4.25mM; \circ PP 4.5mM; + PP 4.75mM) in synaptosomes from cerebral cortex of rats. The graphs show double-reciprocal plots of apyrase for ADP concentrations (0.1, 0.15, 0.2, 0.25 mM) in the absence and in the presence of Phe (A) or PP(B). All experiments were repeated at least three times and similar results were obtained. Data presented were from individual experiments.

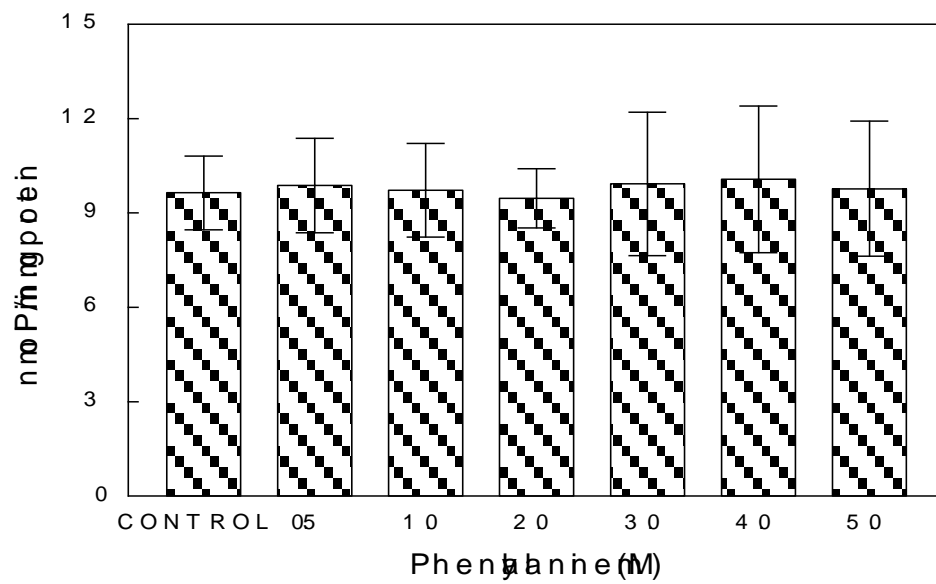
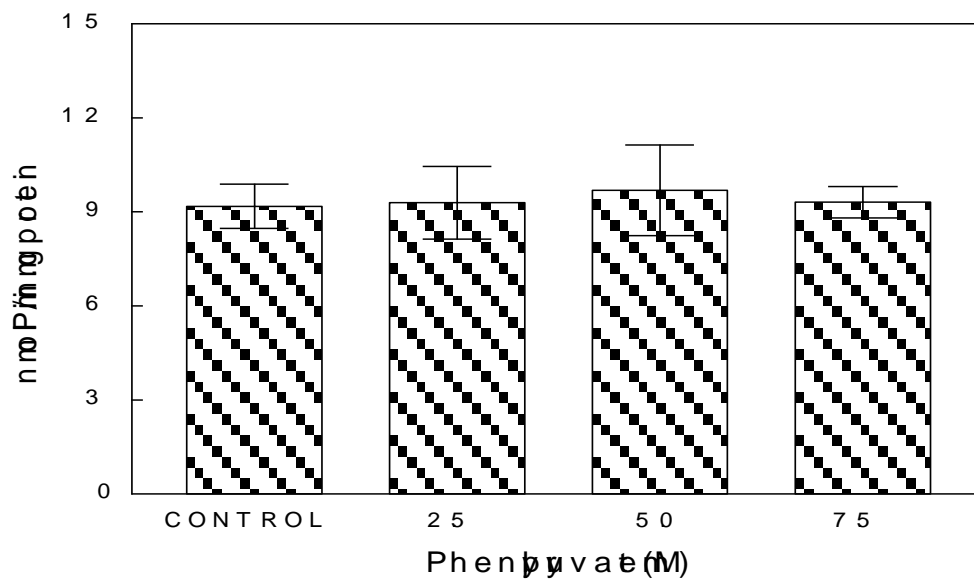
Fig. 3 : Competition plot. The concentration of Phe or PP at which the inhibition was the same for ADP hydrolysis was chosen for the Chevillard plot. The assay conditions are described in Material and methods. Incubation time was 20 min. Inhibitor A (Phe) at $P = 0$ was 1.5 mM, and inhibitor B (PP) at $P = 0$ was 5 mM. Data are mean \pm SD for 3 independent experiments performed in duplicate.

Fig. 4 : Effect of phenylalanine (A) or phenylpyruvate (B) on 5'-nucleotidase activity. Data are mean \pm SD for 4 independent experiments performed in duplicate.

A**B**





A**B**

4.2 - Resultados que não constam no artigo.

4.2.1 - Efeito da alanina sobre as atividades da ATP-difosfoidrolase e da 5'-nucleotidase.

Quando testado o efeito da alanina (Ala) sobre a atividade da ATP-difosfoidrolase de córtex cerebral de ratos, a atividade do grupo controle foi de $53,09 \pm 1,34$ nmol Pi por min por mg de proteína para a hidrólise do ADP, similar aos dados anteriormente obtidos no laboratório (Battastini et al., 1991).

O efeito da Ala sobre a atividade da ATP-difosfoidrolase pode ser observado na figura 4.1 . A alanina não alterou significativamente a hidrólise do ADP ($F_{(6,14)} = 1.5107$; $p > 0.05$).

O efeito da Ala sobre a atividade da 5'-nucleotidase também foi verificado. A atividade para o grupo controle foi de $7,35 \pm 1,24$ nmol Pi por min por mg de proteína para a hidrólise do AMP, similar aos dados anteriormente encontrados no laboratório. A atividade da enzima não foi significativamente alterada pela Ala ($F_{(6,21)} = 0.050$; $p > 0.05$) (figura 4.2).

4.2.2 - Efeito da alanina sobre a inibição causada por fenilalanina e fenilpiruvato na atividade da ATP-difosfoidrolase.

Para verificar se a inibição causada por Phe e PP sobre a atividade da ATP-difosfoidrolase poderia ser revertida pela Ala, concentrações crescentes deste aminoácido (0,5 a 4 mM) foram adicionadas ao sistema de incubação da enzima juntamente com Phe ou PP nas concentrações em que causaram maior inibição sobre a hidrólise do ADP, 1,5 mM e 5 mM, respectivamente. Os resultados indicaram que a Ala nestas concentrações não foi capaz de reverter os efeitos inibitórios da Phe ($F_{(7,16)} = 4.0581$; $p < 0.01$) e de seu metabólito PP ($F_{(7,16)} = 6.1337$; $p < 0.01$) (figuras 4.3 e 4.4 respectivamente).

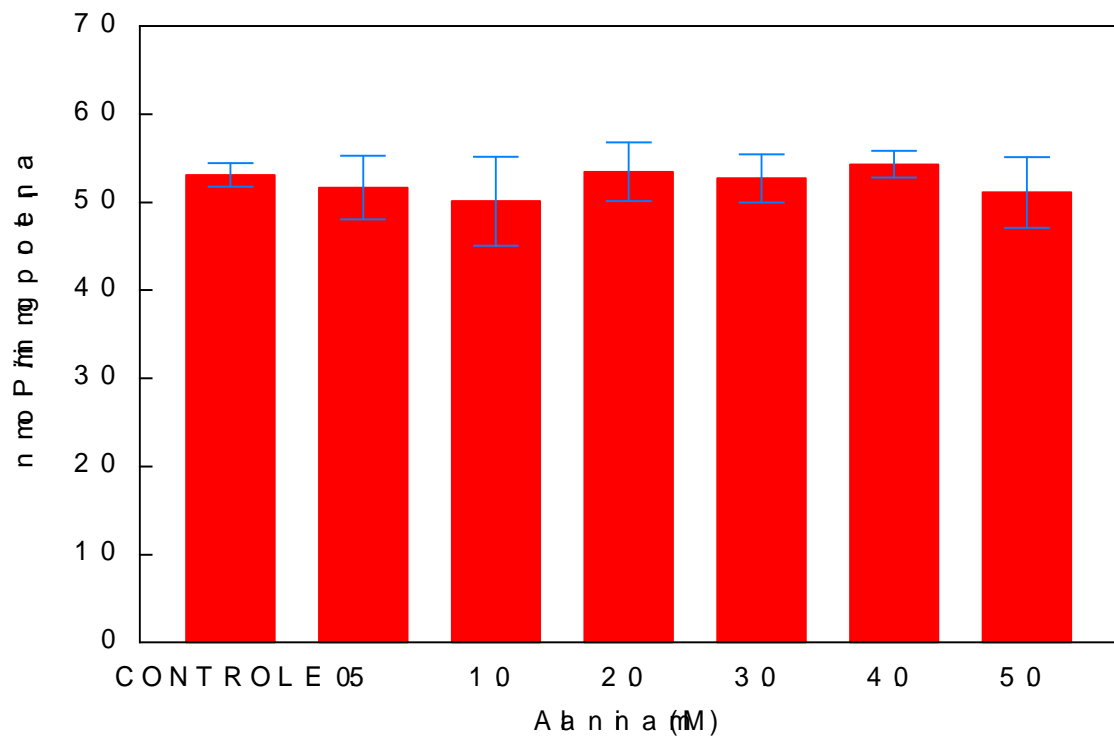


Fig. 4.1 - Efeito da alanina sobre a atividade da ATP-difosfoidrolase em sinaptossoma de córtex cerebral de ratos. Os dados representam média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em duplicata.

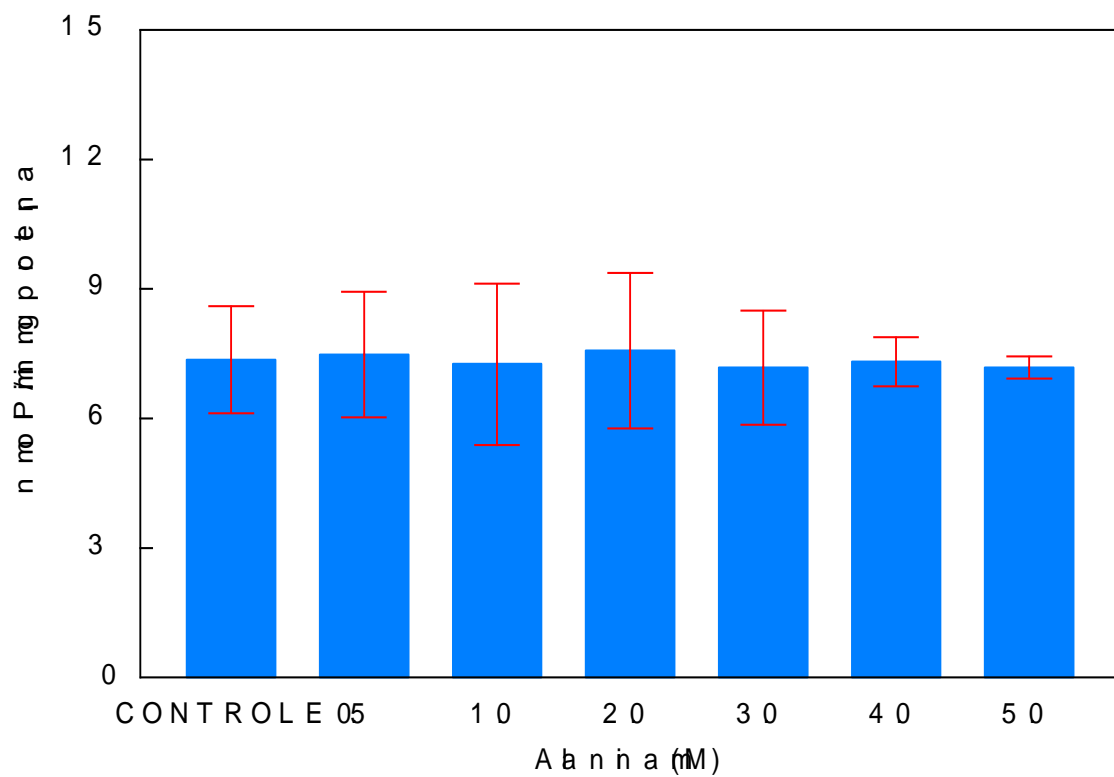


Fig 4.2 - Efeito da alanina sobre a atividade da 5'-nucleotidase de sinaptossoma de c3rtex cerebral de ratos. Os dados representam m3dia \pm desvio padr3o de 4 experimentos independentes realizados em duplicata.

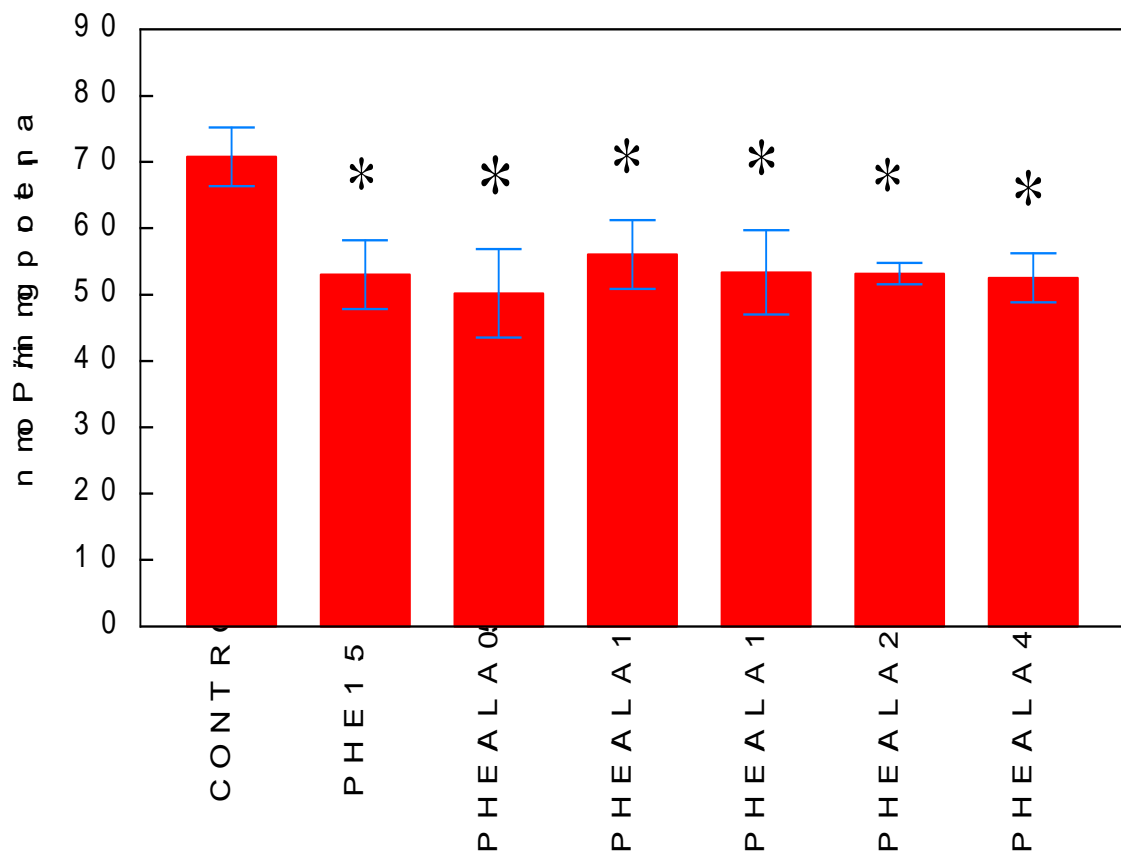


Fig 4.3 - Efeito da associação de alanina com fenilalanina (1.5 mM) sobre a atividade da ATP-difosfoidrolase. Os dados representam média \pm desvio padrão de 3 experimentos realizados em duplicata. Com exceção do controle, a fenilalanina foi adicionada ao sistema de incubação na concentração final de 1.5 mM. * = $p < 0.01$ diferente do controle (teste de Duncan).

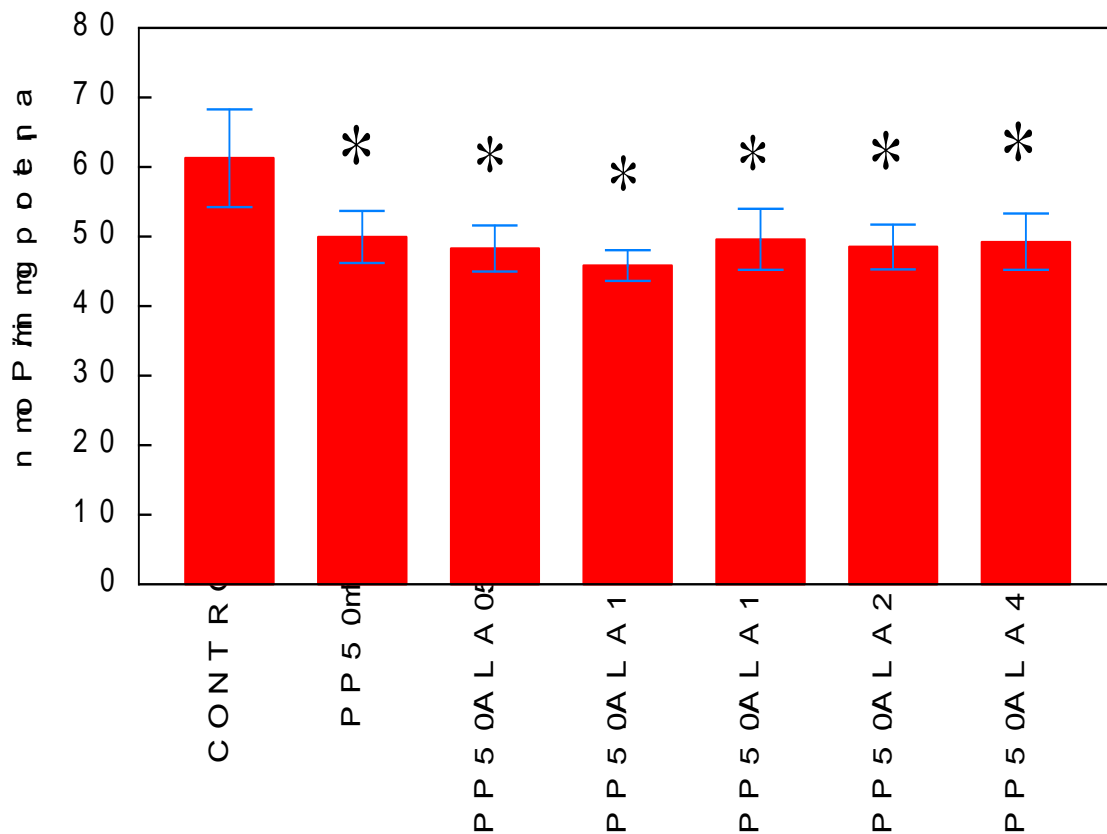


Fig 4.4 - Efeito da associação de alanina com fenilpiruvato sobre a atividade da ATP-difosfohidrolase de sinaptossoma de córtex cerebral de ratos. Os dados representam média \pm desvio padrão de 3 experimentos realizados em duplicata. Com exceção do controle, o fenilpiruvato foi adicionado ao sistema de incubação PP com concentração final de 5.0 mM. * = $p < 0.01$ diferente do controle (teste de Duncan).

5 - DISCUSSÃO

A hidrólise extracelular de nucleotídeos, principalmente do ATP, é de grande importância funcional não somente durante a transmissão sináptica, onde ela opera na eliminação do sinal, mas ela também participa de um comportamento crucial para a sobrevivência e diferenciação das células neuronais *in vitro* e presumivelmente durante o desenvolvimento neuronal *in vivo* (Zimmermann, 1996).

A hidrólise do ATP até adenosina significa simultaneamente a remoção do nucleotídeo e a formação de adenosina, ou seja, a substituição de um neurotransmissor por um neuromodulador. O eficiente controle sobre a transmissão sináptica requer um mecanismo para determinar a ação dos neurotransmissores. O ATP é hidrolisado até adenosina por enzimas ligadas à membrana (ecto-nucleotidasas). Estas enzimas determinam o tempo da ação neurotransmissora do ATP na fenda sináptica (Todorov et al., 1997). A quebra do ATP (e do ADP) também agem reduzindo a concentração extracelular destes nucleotídeos captados pelos receptores purinérgicos P2 que mediam várias respostas biológicas ao ATP e ao ADP (Kobayaski et al., 1997). A atividade da ATP-difosfohidrolase resulta na hidrólise destes nucleotídeos para AMP, que é, a seguir, degradado à adenosina pela ação da 5'-nucleotidase (Robson et al., 1997). A atividade da ATP-difosfohidrolase sinaptossomal de cérebro de rato é reduzida por metais pesados, tais como alumínio (Schetinger et al., 1995) conhecido por ser neurotóxico, e por THA, uma droga proposta para o tratamento da Doença de Alzheimer (Bonan et al., 1997). Suramina, um antagonista do purinoceptor P2, reduz a atividade apirásica em sinaptossoma de hipocampo e a retenção da aprendizagem da esQUIVA inibitória (Bonan et al., 1999).

A hidrólise do ATP e do ADP na hemostasia, evitando a formação de microtrombos nos vasos cerebrais pode ser importante na prevenção de lesões cerebrais. Na hipoxia, a quebra de ATP e ADP circulante para adenosina é uma ação protetora para assegurar o suprimento suficiente de sangue para regiões vitais do corpo, tais como tecido cerebral, por prolongada vasodilatação. Pela conversão do ADP, liberado da agregação

plaquetária e/ou células vermelhas hemolisadas para AMP, a enzima pode participar de um papel importante na prevenção da formação de microtrombos em vasos cerebrais (Frasseto et al, 1993).

O presente estudo foi dividido em duas partes. Na primeira parte, desenvolvida no artigo enviado para publicação, em anexo, mostramos que Phe e PP inibem significativamente *in vitro* a atividade da ATP-difosfoidrolase de sinaptossoma de córtex cerebral de ratos. No entanto, a Phe e o PP não alteraram significativamente a atividade da 5'-nucleotidase da mesma fração. Em estudos prévios, nós demonstramos que a Phe e seu metabólito desaminado PP têm efeitos opostos sobre a atividade da ATP-difosfoidrolase: em baixas concentrações (1-3mM) Phe inibe a atividade da enzima enquanto que o PP estimula; em altas concentrações (4-6 mM), Phe estimula e PP inibe a atividade da enzima (Wyse et al., 1994). Nós temos postulado que a enzima tem dois sítios de ligação para Phe e PP com diferentes afinidades pelos dois metabólitos, um estimulando e outro inibindo a atividade da enzima (Wyse et al., 1994). Nesta primeira parte do trabalho, nós investigamos o mecanismo de inibição da enzima por Phe e PP. Os resultados obtidos com o “plot” de Chevillard mostraram que as duas substâncias agem sobre o mesmo sítio e o “plot” de Lineweaver-Burk sugeriu que este sítio é o sítio ativo. No entanto, a inibição máxima alcançada foi de aproximadamente 20% para cada uma das substâncias, e sua competição com o substrato (ADP) ocorre somente a uma estreita faixa de concentração sendo revertida por altas concentrações de cada substância (Wyse et al., 1994), um fato difícil de explicar por uma simples competição no sítio ativo. Nós estamos hipotetizando a existência de um sítio de ligação para ADP, Phe e PP, onde ADP age aumentando e Phe e PP agem diminuindo a atividade da enzima. Nossos resultados indicam que Phe e PP são inibidores para somente uma das enzimas (ATP-difosfoidrolase) envolvidas na cadeia enzimática para hidrólise completa do ATP à adenosina na fenda sináptica. Porém, é possível especular que o decréscimo da atividade da ATP- difosfoidrolase em 20% seja suficiente para prover uma menor quantidade de AMP para a 5'-nucleotidase e desta maneira pode reduzir a clivagem de ATP para formação de adenosina em alguma extensão. Como consequência da inibição, ocorreria o aumento de ATP na fenda sináptica podendo promover um aumento acentuado nos níveis intracelulares de cálcio mediado

pelos receptores P2X, o qual poderia representar um dano significativo, como aquele induzido pelo excesso de glutamato (Edwards et al., 1992).

Na segunda parte do trabalho, verificamos que a alanina não exerce efeito significativo sobre as atividades da ATP-difosfohidrolase e da 5'-nucleotidase, nem altera o efeito inibitório da Phe e do PP na hidrólise do ADP, diferentemente do efeito observado para fenilalanina em córtex de ratos em relação à atividade da Na^+, K^+ -ATPase (Wyse et al., 1995; Wyse et al., 1999), à fosforilação de proteínas do citoesqueleto (Carreras, 1999), e ao peso da estrutura (Pedron, 1992).

Os mecanismos responsáveis pelo dano cerebral na fenilcetonúria parecem ser múltiplos e pouco conhecidos. Há muitas evidências de que o acúmulo de Phe é o principal fator, afetando o desenvolvimento cerebral em várias fases, mas o papel dos metabólitos da Phe permanece obscuro (Ushakova et al., 1997).

Tem sido sugerido que a Phe interfere com a seletiva estabilização do desenvolvimento das sinapses (Bauman e Kemper, 1982; Changeux e Dauchin, 1976; Hommes e Matsuo, 1987; Nigan e Labor, 1979). Os dados aqui apresentados indicam que a Phe inibe a atividade da ATP-difosfohidrolase em concentrações usualmente encontradas no plasma e no fluido espinhal de pacientes com PKU (1-3mM). Contudo, os níveis de PP no plasma e no fluido espinhal em pacientes com PKU são menores (menos que 1mM) do que a concentração necessária para inibir a atividade da ATP-difosfohidrolase (4 a 6 mM).

A administração de alanina previne a redução da atividade da Na^+, K^+ -ATPase e do peso cortical cerebral sem melhorar a performance dos ratos nos testes de comportamento. Estes efeitos da Ala podem ser devidos à reversão do efeito inibitório da Phe sobre a piruvatoquinase prevenindo a redução da captação cerebral de glicose (Rodrigues et al., 1990), mantendo a síntese de ATP. Considerando a importância da ATP-difosfohidrolase no funcionamento do sistema nervoso, se isto realmente ocorrer in vivo, a inibição da atividade da ATP-difosfohidrolase poderia ser um fator importante na gênese da disfunção cerebral, já que não é revertida por Ala.

6 – CONCLUSÕES

- A fenilalanina (1.5 mM) inibe competitivamente a hidrólise do ADP em relação a este substrato.
- O fenilpiruvato (5.0 mM) inibe competitivamente a hidrólise do ADP em relação a este substrato.
- A fenilalanina (1.5 mM) e o fenilpiruvato (5.0 mM) competem entre si ao inibirem a hidrólise do ADP.
- A alanina não interfere significativamente na hidrólise do ADP.
- A fenilalanina, o fenilpiruvato e a alanina não têm efeito significativo sobre a hidrólise do AMP.
- A alanina (0.5 a 4.0 mM) não é capaz de reverter as inibições causadas por fenilalanina (1.5 mM) e por fenilpiruvato (5.0 mM).

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPEL, S. H. Inhibition of brain protein synthesis; an approach to the biochemical basis of neurological dysfunction in the aminoacidurias. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 29: 63 - 70, 1966.
- BATTASTINI, A. M. O.; EMANUELLI, T.; KOESTER, L.; WINK, M.R.; BONAN, C.D.; DIAS, R.D. & SARKIS, J.J.F. Studies on the anchorage of ATP-diphosphohydrolase in synaptic plasma membranes from rat brain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30: 669 - 678, 1998.
- BATTASTINI, A. M. O.; OLIVEIRA, E. M.; MOREIRA, C. M.; BONAN, C. D.; SARKIS, J. J. F. & DIAS, R. D. Solubilization and characterization of an ATP-diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from brain synaptic plasma membranes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37: 209 - 219, 1995.
- BATTASTINI, A. M. O.; ROCHA, J. B. T.; BARCELOS, C. K.; DIAS, R. D. & SARKIS, J. J. F. Characterization of an ATP-diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem. Res.* 16: 1303 - 1310, 1991.
- BAUMAN, M. L. & KEMPER, T. L. Curtailed histoanatomic development of the brain in phenylketonuria. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 33: 181, 1982.
- 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 - 435, 1983.
- BERRY, H. K.; BOFINGER, M. K.; HUNT, M. M.; PHILIPS, P. P. & GUILFALLE, M. B. Reduction of cerebrospinal fluid phenylalanine after oral administration of valine, isoleucine and leucine for phenylketonuria. *Pediatr. Res.* 16: 751 - 755, 1982.
- BERRY, H. K.; BRUNNER, R. L.; HUNT, M. M. & WHITE, P. P. valine, isoleucine and leucine: a new tratament for phenylketonuria. *Am. J. Dis. Child.* 44: 539 - 544, 1990.

- BONAN, C. D.; DIAS, M. M.; BATTASTINI, A. M. O.; DIAS, R. D. & SARKIS, J. J. F. Inhibitory avoidance learning inhibits ecto-nucleotidase activities in hippocampal synaptosomes of adult rats. *Neurochem. Res.* 23: 979 - 984, 1998.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 218-254, 1976.
- BRUNNER, R. L.; JORDAN, M. K. & BERRY, H. K. Early treated phenylketonuria: neuropsychological consequences. *J. Pediatr.* 102: 831 - 835, 1983.
- CABALSKA, B.; DUSZYNSKA, N.; BORZYMOWSKA, J. et al. Termination of dietary treatment in phenylketonuria. *Eur. J. Pediatr.* 126: 253, 1977.
- CARL, S. A. L.; SMITH, T. M. & KIRLEY, T. L. Cross-linking induces homodimer formation and inhibits enzymatic activity of chicken stomach ecto-apyrase. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 44: 463 - 470, 1998.
- CARL, S. L. & KIRLEY, T. L., Immunolocalization of the ecto-apyrase in chicken gizzard and stomach. *J. Biol. Chem.* 272: 23645 - 23652, 1997.
- CARRERAS, A L R. Efeito dos aminoácidos fenilalanina e/ou alanina sobre a incorporação de ³² P in vitro nas proteínas do citoesqueleto de córtex cerebral de ratos jovens. 1999. Dissertação (Ciências Biológicas (Bioquímica)) -Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- CESPEDES, C. de; THOENE, J.G.; LOWER, K. & CHRISTENSEN, H.N. Evidence for inhibition of exodus of small neutral amino acids from non-brain tissues in hyperphenylalaninaemic rats. *J. Inher. Metab. Dis.* 12: 166 - 180, 1989.
- CHAN, K.; DELFERT, D. & JUNGER, K.D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157: 375-380, 1986.
- COCKBURN, F.; BARWELL, B. E.; BRENTON, D. P. et al. Recommendations on the dietary management of phenylketonuria. *Arch. Dis. Child.* 68: 426 - 427, 1993.
- CONN, A. R. & STEELE, R. D. Transport of α -keto analogues of across amino acids blood-brain barrier in rats. *Am J. Physiol.* 243 (Endocrinol. Metab.): 272 - 277, 1982.

- DAVID, J. C.; DAIRMAN, W. & UNDERFRIEND, S. On the importance of decarboxylation in the metabolism of phenylalanine, tyrosine and tryptophane. *Arch. Biochem. Biophys.* 160: 561 - 568, 1974.
- EDWARDS, D. J. & BLAU, K. Aromatic derived from phenylalanine in the tissues of rats with experimentally induced phenylketonuric-like characteristic. *Biochem. J.* 130: 495 - 503, 1972.
- FILIPPINI, A.; TAFFS, R. E.; AGUI, T. & SITKOVSKY, M. V. Ecto-ATPase activity in cytolytic T- lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. *J. Biol. Chem.* 265: 334 - 340, 1990.
- FOIS, A.; ROSEMBERG, C. & GIBB, F. A. The electroencephalogram in phenylpyruvic oligofrenia. *Electroencephagr. Clin. Neurophysiol.* 7: 569 - 578, 1955.
- FÖLLING, A. Über ausscheidung von phenylbrenztraubensäure in den harn als in verbindung mit imbezillität. *Z. Physiol. Chem.* 227: 169 - 176, 1934.
- FRIED, P. A.; KAPPELMAN, A. H. & KAUFMAN, S. Partial purification and characterization of tryptophan hydroxylase from rabbit hindbrain. *J. Biol. Chem.* 247: 4165 - 4173, 1972.
- FULTON, T. R.; TRIANO, T.; RABE, A. & LOO, Y. H. Phenylacetate and enduring behavioral deficit in experimental phenylketonuria. *Life Sciences*, 27: 1271 - 1281, 1980.
- GAYLE III, R. B.; MALISZEWSKI, C. R.; GIMPEL, S. D., SCHOENBORN, M.A.; GASPARY, R.G.; RICHARDS, C.; BRASEL, K.; PRICE, V.; DROSOPOULOS, J.H.F.; ISLAM, N.; ALYONYCHEVA, T.N.; BROEKMAN, M.J. & MARCUS, A.J. Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39. *J. Clin. Invest.* 101: 1851 - 1859, 1998.
- GIUGLIANI, R.; COSTA, J. C.; DUTRA FILHO, C. S.; DUTRA, J. C.; PEREIRA, M. L. S., et al. Successful therapy of hyperphenylalaninemia due to defective tetrahydrobiopterin metabolism in two siblings. *Rev. Bras. Gen.* 9: 685 - 692, 1986.
- GRAU, C. R. & STELLE, R. Phenylalanine and tyrosine utilization in normal and phenylalanine-deficient young mice. *J. Nutr.* 53: 591 - 571, 1954.

- HANDA, M., GUIDOTTI, G. Purification and cloning of ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*solanum tuberosum*). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 218: 916 - 923, 1996.
- HERSCHKOWITZ, N. In: *Inborn Errors of Metabolism in Humans* (COCKOBURN, F., GILTZELMAN, R., Eds.) MTP Press Limited. 157 - 160, 1982.
- HOTZMAN, N. A.; WELCHER, D. W. & MELLITS, E. D. Termination of restricted diet in children with phenilketonuria. A rondomized controlled study. *N. Engl. J. Med.*, 314: 593 - 598, 1986.
- HOTZMAN, N. A.; KRONMAL, R. A.; VAN DOONINCK, W.; AZEN, C. & KOCH, R. Effect of age at loss of dietary control on intellectual performance and behavior of children wiht phenylketonuria. *N. Engl. J. Med.* 314: 593 - 598, 1986.
- HUETHER, G.; NEUHOFF, V. & KAUS, R. Brain development in experimental hyperphenylalaninemia: disturbed proliferation and reduced cell numbers in the cerebellum. *Neuropediatr.* 14: 12 - 19, 1983.
- 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 - 341, 1985.
- JERVIS, G. A. Phenylpyruvic oligophrenia: introductory study of 50 cases of mental deficiency associated with excretion of phenylpyruvic acid. *Arch. Neurol. Psychiatr. (Chic)*, 38: 944 - 963, 1937.
- JERVIS, G. A. Studies on phenylpyruvis oligophrenia. The position of the metabolic error. *J. Biol. Chem.* 169: 651 - 656, 1947.
- JERVIS, G. A. Studies on phenylpyruvic oligophrenia. Phenylpyruvic acid content of blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 81: 715 - 720, 1952.
- KANG, E. S.; SOLLE, N. & GERALD, P. S. Results of treatment and termination of the diet in phenylketonuria. *Pediatrics.* 46, 881 - 890, 1970.
- KAUFMAN, S. A new cofactor required for the enzymatic conversion of phenylalanine to tirosine. *J. Biol. Chem.* 230: 931 - 939, 1958.

- KAUFMAN, S. The structure of the phenylalanine hydroxylatyon cofactor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 50: 1083 - 1093, 1963.
- KAUFMAN, S. Metabolism of phenylalanine hydroxylation cofactor. *J. Biol. Chem.* 242: 3934 - 3943, 1967.
- KAUFMAN, S. An evolution of the possible neurotoxicity of metabolites of phenylalanine. *J. Pediatr.* 114: 895 - 900, 1989.
- KEGEL, B.; BRAUN, N.; HEINE, P.; MALISZEWSKI, C. R. & ZIMMERMANN, H. An ecto-ATPase and an ecto-ATP-diphosphohydrolase are expressen in rat brain. *Neuropharmac.* 36: 1189 - 1200, 1997.
- KOMOSZYNSKI, M. & WOJTCZAK, A. Apyrases (ATP-diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): fuction and relationship to ATPases. *Biochem. Biophys. Acta* 1310: 233 - 241, 1996.
- KRISHNAN, P.S. Studies on apyrases. I. Purification of potato apyrase by fractional precipitation with ammonium sulfate. *Arch. Biochem.* 20: 272, 1949.
- LATERRA, J. & GOLDSTEIN, G. W. Brain microvessels and microvascular cells in vitro. In: *The Blood-Brain Barrier Cellular and Molecular Biology*, Pardridge, W. M. (Ed.), Raven Press Ltd, New York, 1 - 24, 1993.
- LEVY, H. L. Phenylketonuria. *Pediatr. Rev.* 7: 269 - 275, 1986.
- LOO, Y. H.; FULTON, MILLER, K. & WINSNIEWSKI, M. H. Phenylacetate effects in synaptic development. *Life Science.* 27: 1280 - 1289, 1980.
- MALISZEWSKI, C. R.; DELESSESSE, G. J.; SHOENBORN, M. A., et al. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J. Immunol.* 153: 3574 - 3583, 1994.
- Mc KEAN, C. M. The effects of high levels phenylalanine concentrations on brain serotonin and catecholamine metabolism in human brain. *Br. Res.* 47: 469 - 476, 1972.
- MEYERHOF, O. The origin of the reaction of Harden and Young in cell-free alcoholic fermentation. *J. Biol. Chem.* 157: 105 - 119, 1945.

- MIURA, Y.; HIROTA, K.; ARAI, Y. & YAGI, K. Purification and partial characterization of adenosine diphosphatase activity in bovine aorta microsomes. *Tromb. Res.* 46: 685-695.
- MOSS, A. R. & SCHOENHEIMER, R. The conversion of phenylalanine to tyrosine in normal rats. *J. Biol. Chem.* 135: 415 - 429, 1940.
- NADLER, H. L. & HSIA, D. Y. Y. Epinephrine metabolism in phenylketonuria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 107: 721 - 723, 1961.
- NAGY, A. K.; HOUSER, C. R. & DELGADO-ESCUETA, A. V. Synaptosomal ATPase activities in temporal cortex and hippocampal formation of humans with focal epilepsy. *Brain Res.* 529: 192 - 201, 1990.
- NAGY, A. K.; KNOWLES, A. F. & NAGAMI, G. T. Molecular cloning of the chicken oviduct ecto-ATP-diphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* 273: 16043 - 16049, 1998.
- NAGY, A. & DELGADO-ESCUETA, A. V. Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using nontoxic isosmotic gradient (Percoll). *J. Neurochem.* 43: 1114 - 1123, 1984.
- NYHAN, W. L. Phenylketonuria. In : BERGSMAN, D. (Ed.) *Birth defects compendium*. 2nd ed. New York, Alan R. Liss. Inc., 866 - 867, 1979.
- OLDENDORF, W. H. Saturation of blood brain barrier transport of amino acids in phenylketonuria. *Arch. Neurol.* 28: 45 - 48, 1973.
- OLIVEIRA, E. M.; BATTASTINI, A. M. O.; MEIRELLES, M. N. L.; MOREIRA, C. M.; DIAS, R. D. & SARKIS, J. J. F. Characterization and localization of an ATP-diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) in sarcolemal membrane from rat heart. *Mol. Cell. Biochem.* 170: 115 - 123, 1997.
- PAINE, R. S. The variability and manifestations of untreated patients with phenylketonuria (phenylpyruvic aciduria). *Pediatr.* 20: 290 - 302, 1957.
- PEDRON, Cristina Grimaldi. Efeito da administração de alanina a ratos submetidos à fenilcetonúria experimental pós-natal. 1992. Dissertação (Ciências Biológicas (Bioquímica)) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- PENROSE, L. & QUASTEL, J. H. Metabolis studies in phenylketonuria. *Biochem. J.* 31: 266 - 268, 1937.

- PIETZ, J.; SCHMITDT, E.; MATTHIS, P.; KOBIALKA, B. & SONNEVILLE, L. EEGs in phenylketonuria, I : Follow-up to adulthood; II: Short-term diet-related changes in EEGs and cognitive function. *Develop. Med. Child Neurol.* 35: 54 - 64, 1993.
- PLESNER, L. Ecto-ATPases: identities and functions. *Int. Rev. Cytol.* 158: 141-214, 1995.
- PRATT, O. E. Transport inhibition in the pathology of phenylketonuria and other inherited metabolic diseases. *J. Inh. Metab. Dis.* 5 (Suppl.) 75 - 81, 1982.
- POLEY, J. R. & DUMERMUTH, G. EEG findings in patients with PKU. In *HOLT Ks*, Eedinburgh, Churchill Livingstone, Ltd, 61, 1968.
- RAVELIC, V. & BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50: 413 - 492, 1998.
- RODRIGUES, N. R.; WANNMACHER, C. M. D.; DUTRA-FILHO, C. S.; PIRES, R. F.; FAGAN, P. R. & WAJNER, M. Effect of phenylalanine, p-chlorophenylalanine and alpha-methylphenilalanine on glucose uptake in vitro by the brain of youngrats. *Biochemical Society Transactions*, 18 :419-419, 1990.
- SARKIS, J. J. F.; BATTASTINI, A. M. O.; OLIVEIRA, E. M.; FRASSETO, S. S. & DIAS, R. D. ATP-diphosphohydrolase: an overview. *Ciência e Cultura (Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science)*, 47: 131 - 136, 1995.
- SCRIVER, C. R. & CLOW, C. L. Phenylketonuria: Epitome of human biochemical genetics. *New Engl. J. Med.* 303: 1336 - 1342, 1980.
- SCRIVER, C. R.; KAUFMAN, S. & WOO, S. L. C. The hyperphenylalaninemias. In SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SLY, W. S. & VALLE, D. (Editors). *The Metabolic Basis of Inherited Disease*: McGraw-Hill, New York, 6th 495 - 546, 1989.
- SCRIVER, C. R.; KAUFMAN, S.; EISENSMITH, R. C. & WOO, S. L. C. The hyperphenylalaninemias. In SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SLY, W. S. & VALLE, D. (Editors). *The Metabolic Basis of Inherited Disease*: McGraw-Hill, New York, 7th : 1015 - 1075, 1995.

- SHAH, S. ; PETERSON, N. A. & Mc KEAN, C. M. Lipid composition of human cerebral white matter and myelin in phenylketonuria. *J. Neurochem.* 19: 2369 - 2376, 1972.
- SHAW, D. W. W. ; WEINBERGER, E. D. & MARAVILLA, K. R. Cranial MR in phenylketonuria. *J. Comp. Ass. Tomogr.*, 14: 458 - 460, 1990.
- SILBERBERG, D. H. Phenylketonuria metabolites in cerebellum culture morphology. *Arch. Neurol.*, 17: 524 - 529, 1967.
- SMITH, I. ; BEASLEY, M. G. & ADES, A. E. Intelligence and quality of dietary treatment in phenylketonuria. *Arch. Dis. Child.* , 65: 472 - 478, 1990.
- SMITH, Q. R. The blood-brain barrier and the regulation of amino acid uptake and availability to brain. In: VRANIC, M. et al. (Eds.), *Fuel Homeostasis and Nervous System*, Plenum Press, New York, 1991.
- SMITH, T. M.; CARL, S. A. L. & KIRLEY, T. L. Immunological detection of ecto-ATPase in chicken and rat tissues: characterization, distribution, and a cautionary note. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 45: 1057 - 1066, 1998.
- SMITH, T. M. & KIRLEY, L. Cloning, sequencing and expression of a human brain ecto-ATPase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-ATPases. *Biochem. Biophys. Acta* 1386: 65 - 78, 1998.
- SMITH, T. M. & KIRLEY, L. Glycosylation is essential for functional expression of a human brain ecto-ATPase. *Biochemistry* 38: 1509 - 1516, 1999.
- SMITH, T. M. & KIRLEY, L. Site-directed mutagenesis of a human brain ecto-ATPase: evidence that the E-type ATPases are related to the Actin/Heat Shock 70/Sugar Kinase Superfamily. *Biochemistry* 38: 321 - 328, 1999.
- STROBEL, R. S.; NAGY, A. K.; KNOWLES, A. F.; BUEGEL, J. & ROSEMBERG, M. D. Chicken oviductal ecto-ATP-diphosphohydrolase purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 271: 16323 - 16331, 1996.
- TAYLOR, E. H. ; HOMES, F. A. & STEWART, D. E. Effect of experimental hyperphenylalaninemia on Biogenic amine synthesis at later stages of brain development. *Biochem. Med.*, 29: 307 - 317, 1983.

- THOMPSON, J. & THOMPSON, M. W. Genética médica humana. In: *Genética Médica*, 4 ed, 71 - 72, 1988.
- THOMPSON, A. J. ; SMITH, I.; BRENTON, D. ; YOUL, B. D. ; RYLANCE, G. ; DAVIDSON, D. C. ; KENDAL, B. & LEES, A. J. Neurological deterioration in young adults with phenylketonuria. *Lancet*, 336: 602 - 605, 1990.
- TOURIAN, A. Activation of phenylalanine hydroxylase by phenylalanine. *Biochim. Biophys. Acta*, 242: 345 - 354, 1971.
- TOURIAN, A. & SIDBURY, J. B. Phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. In STABURY, J. B. ; WYNGARDEN, J. B. & FREDICKSON, D. S. *The Metabolic Basis Of Inherited Disease*. 5 ed., New York, Mc Graw Hill, 270 - 286, 1983.
- UDENFRIEND, S. & COOPER, J. R. The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. *J. Biol. Chem.*, 194: 503 - 511, 1952.
- VALENZUELA, A.; CAMPO, G. D.; MARÍN, E. & TRAVERSO-CORI, A. Effects of protein-modifying reagents on an isoenzyme of potato apyrase. *Biochem. J.* 133: 755 - 763, 1973.
- WANG, T. F. & GUIDOTTI, G. CD39 is an ecto-(Ca²⁺, Mg²⁺) apyrase. *J. Biol. Chem.* 271: 9898 - 9901, 1996.
- WANG, T. F.; OU, Y. & GUIDOTTI, G. The transmembrane domains of ecto-apyrase (CD39) affect its enzymatic activity and quaternary structure. *J. Biol. Chem.* 273: 24814 - 24821, 1998.
- WANG, T. F. & GUIDOTTI, G. Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system. *Brain Res.* 790: 318 - 322, 1998.
- WANG, T. F.; ROSEMBERG, P. A. & GUIDOTTI, G. Characterization of brain ecto-apyrase: evidence for only one ecto-apyrase (CD39) gene. *Mol. Brain Res.* 47: 295 - 302, 1997.
- WINK, M. R. Ecto-apyrase de cérebro de ratos: investigação dos aminoácidos envolvidos na catálise e possível regulação por fosforilação. *Tese de Mestrado*, Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.

- WOMACK, M. & ROSE, W. C. Feeding experiments with mixtures of highly purified amino acids. The relation of phenylalanine and tyrosine to growth. *J. Biol. Chem.*, 107: 449 - 451, 1934.
- WURTMAN, R. J. & WURTMAN, J. J. Toxic effects of flood constituents on the brain. In GUROFF, G. (Ed.), *Nutr. Br.*, 4: 29 - 78, Raven, New York, 1979.
- WURTMAN, R. J. ; HEFTI, F. & MELAMED, E. Precursor of neurotransmitter synthesis. *Pharmacol. Rev.* , 32: 315 - 335, 1980.
- WYSE, A.T.S. Atividade da ATP-difosfohidrolase (EC 3.6.1.5) em fração sinaptosomal de córtex cerebral de ratos na fenilcetonúria experimental. *Tese de Mestrado*. Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1991.
- WYSE, A. T. S. Atividade da Na⁺,K⁺-ATPase de membrana plasmática sináptica de córtex cerebral de ratos na fenilcetonúria experimental. *Tese de Doutorado*. Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.
- WYSE, A. T. S. ; SARKIS, J. J. F. ; CUNHA - FILHO, J. S. ; TEIXEIRA, M V. ; SCHETINGER, M. R. ; WAJNER, M. & WANNMACHER, C. M. D. Effect of phenylalanine and its metabolites on ATP-diphosphohydrolase activity in synaptosomes from rat cerebral cortex. *Neurochem. Res.*, 19: 1175 - 1180, 1994.
- WYSE, A. T. S. ; SARKIS, J. J. F. ; CUNHA - FILHO, J. S. ; TEIXEIRA, M. V. ; SCHETINGER, M. R.; WAJNER, M. & WANNMACHER, C. M. D. ATP-diphosphohydrolase activity in synaptosomes from cerebral cortex of rats subjected to chemically induced phenylketonuria. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1995.
- WYSE, A T S; WAJNER, M. & WANNMACHER, C.M.D. Kinetics of alanine reversal on the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity by phenylalanine and phenyllactate in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats. *Med. Sci. Res.*, 26: 141-143, 1998.
- WYSE, A. T. S.; NORILER, M. E.; BORGES, L. F.; FLORIANO, P. J.; SILVA, C. G.; WAJNER, M. & WANNMACHER, C. M. D. Alanine prevents the decrease of

Na⁺,K⁺-ATPase activity in experimental phenylketonuria. *Metab. Brain Dis.*, 14: 95-101, 1999.

YUWILER, A.; GELLER, E. & SLATER, G. G. On the mechanism of the brain serotonin depletion in experimental phenylketonuria. *J. Biol. Chem.*, 240: 1170 - 1174, 1965.

ZIMMERMANN, H.; BRAUM, N.; KEGEL, B. & HEINE, P. New insights into molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Neurochem. Int.* 32: 421 - 425, 1998.

ZIMMERMANN, H. Extracellular purine metabolism. *Drug Dev. Res.* 39: 337 - 352, 1996.