

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

**EFEITOS DA HIPERFENILALANINEMIA MATERNA EM RATAS WISTAR
SOBRE ALGUNS PARÂMETROS DE METABOLISMO ENERGÉTICO NA PROLE
E EFEITO PROTETOR DA ASSOCIAÇÃO DE PIRUVATO COM CREATINA**

Vanessa Trindade Bortoluzzi

Orientador: Prof. Dr. Clóvis Milton Duval Wannmacher

Porto Alegre, fevereiro de 2014

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

**EFEITOS DA HIPERFENILALANINEMIA MATERNA EM RATAS WISTAR
SOBRE ALGUNS PARÂMETROS DE METABOLISMO ENERGÉTICO NA PROLE
E EFEITO PROTETOR DA ASSOCIAÇÃO DE PIRUVATO COM CREATINA**

Vanessa Trindade Bortoluzzi

Orientador: Prof. Dr. Clóvis Milton Duval Wannmacher

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Janice Carneiro Coelho (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Prof.^a Dr.^a Regina Pessoa Pureur (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Prof.^a Dr.^a Claudia da Silva Funchal (Centro Universitário Metodista - IPA)

Porto Alegre, fevereiro de 2014

CIP - Catalogação na Publicação

Bortoluzzi, Vanessa Trindade

Efeitos da hiperfenilalaninemia materna em ratas wistar sobre alguns parâmetros de metabolismo energético na prole e efeito protetor da associação de piruvato com creatina / Vanessa Trindade Bortoluzzi. -- 2014.

86 f.

Orientador: Clóvis Milton Duval Wannmacher.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Hiperfenilalaninemia materna. 2. Metabolismo energético. 3. Fenilcetonúria. I. Wannmacher, Clóvis Milton Duval, orient. II. Título.

Vou mostrando como sou e vou sendo como posso.

*Jogando meu corpo no mundo,
andando por todos os cantos
e pela lei natural dos encontros,
eu deixo e recebo um tanto.*

Luiz Galvão e Moraes Moreira

AGRADECIMENTOS

aos meus pais, Elvio e Sandra, avós, Neusa e João e irmã, Nicole, por serem essa família amorosa com a qual posso contar a cada passo;

ao professor Clóvis pela oportunidade de fazer mestrado sob sua orientação e, mais do que isso, pela oportunidade de conviver com um orientador que mais do que doutor é um mestre. Mesmo quando ele não estava orientando, eu estive aprendendo, e acho que um mestre talvez seja isso, alguém que, mesmo que involuntariamente, inspira ideias enriquecedoras, construtivas...

aos colegas de laboratório, Iti, Elenara, Thales, Tanise, Rodrigo, Deni, Vivi, Elissa, Letícia e Juliana pela acolhida, companheirismo, por tudo que aprendi com eles, pelos conselhos, pela conversa fiada e risadas que tornam o trabalho mais leve e produtivo. Um agradecimento especial à Iti e à Elenara, que colaboraram ativamente na implementação e execução desse trabalho, e à Priscila Silveira e às ICs pela oportunidade de experimentar um pouquinho o que é ensinar;

ao professor Dutra e seus alunos pela convivência e aprendizado. Um obrigada à parte à Priscila Mazzola, pelo incentivo e participação em levar adiante ideias adicionais ao projeto;

à UFRGS e ao departamento de bioquímica, professores e funcionários, que através de seu trabalho viabilizaram o meu, especialmente Taís e Letícia do biotério, e Cleia, da secretaria, sempre muito solícitas;

ao CNPq pela bolsa concedida e às agências financiadoras que possibilitaram a execução deste trabalho;

às minhas amigas bois, por fazerem parte da minha vida e serem essas pessoas especiais e estimulantes nas quais sempre encontro conforto, um abraço, um sorriso, uma risada, um conselho, um debate sobre qualquer coisa, importante ou não...

às minhas roommates e bois, Rebeca e Suby, que estiveram firmes e fortes junto comigo durante quase todo o decorrer desse mestrado.

SUMÁRIO

PARTE I

| | |
|--|-----------|
| RESUMO..... | 6 |
| ABSTRACT | 7 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 8 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 9 |
| LISTA DE TABELAS | 10 |
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 1.1. Erros inatos do metabolismo..... | 11 |
| 1.2. Fenilcetonúria e Hiperfenilalaninemia..... | 12 |
| 1.2.1. Histórico | 12 |
| 1.2.2. Deficiência de fenilalanina-hidroxilase e classificação das hiperfenilalaninemias | 14 |
| 1.3. Fenilcetonúria e hiperfenilalaninemia materna..... | 22 |
| 1.3.1. Patogênese da Síndrome da Fenilcetonúria Materna | 25 |
| 1.3.2. Cuidados na Gestação Hiperfenilalaninêmica..... | 27 |
| 1.4. Cérebro e metabolismo energético..... | 29 |
| 1.4.1. Creatina-cinase | 30 |
| 1.4.2. Piruvato-cinase | 32 |
| 1.4.3. Adenilato-cinase..... | 33 |
| 2. OBJETIVOS | 35 |
| 2.1. Objetivos gerais | 35 |
| 2.2. Objetivos específicos | 35 |

PARTE II

| | |
|----------------------------|-----------|
| 3. RESULTADOS | 36 |
| ARTIGO | 37 |

PARTE III

| | |
|--|-----------|
| 4. DISCUSSÃO | 58 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 63 |
| 6. PERSPECTIVAS..... | 64 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 65 |

RESUMO

A fenilcetonúria (PKU) é um dos erros inatos do metabolismo mais frequentes. Ela é causada pela deficiência na atividade da fenilalanina hidroxilase, levando à acumulação de fenilalanina e dos seus metabolitos no sangue e tecidos. A PKU ou hiperfenilalaninemia materna não tratada pode resultar em prole não fenilcetonúrica com baixo peso ao nascer e sequelas neonatais, especialmente microcefalia e deficiência intelectual. Os mecanismos subjacentes à neuropatologia da lesão cerebral na síndrome da fenilcetonúria materna são pouco compreendidos. No presente estudo, avaliou-se o possível efeito preventivo da coadministração de creatina e piruvato sobre os efeitos desencadeados pela administração de fenilalanina a ratas Wistar durante a gestação e lactação em algumas enzimas envolvidas na rede de fosforil transferência no córtex cerebral e no hipocampo da prole aos 21 dias de idade. A administração de fenilalanina provocou diminuição do peso corporal, do córtex cerebral e hipocampo e diminuição da atividade da adenilato-cinase e creatina-cinase citosólica e mitocondria. A coadministração de creatina e piruvato foi eficaz na prevenção destas alterações provocadas por fenilalanina, sugerindo que modificações no metabolismo energético podem ser importantes na fisiopatologia da PKU materna. Se estas alterações também ocorrem na PKU materno, é possível que a suplementação com creatina e piruvato à dieta restrita em fenilalanina possa ser benéfica para os filhos de mães fenilcetonúricas.

ABSTRACT

Phenylketonuria (PKU) is the most frequent inborn error of metabolism. It is caused by deficiency in the activity of phenylalanine hydroxylase, leading to accumulation of phenylalanine and its metabolites. Untreated maternal PKU or hyperphenylalaninemia may result in nonphenylketonuric offspring with low birth weight and neonatal sequelae, especially microcephaly and intellectual disability. The mechanisms underlying the neuropathology of brain injury in maternal PKU syndrome are poorly understood. In the present study, we evaluated the possible preventive effect of the co-administration of creatine plus pyruvate on the effects elicited by phenylalanine administration to female Wistar rats during pregnancy and lactation on some enzymes involved in the phosphoryltransfer network in the brain cortex and hippocampus of the offspring at 21 days of age. Phenylalanine administration provoked diminution of body, brain cortex and hippocampus weight and decrease of adenylate kinase, mitochondrial and cytosolic creatine kinase activities. Co-administration of creatine plus pyruvate was effective in the prevention of those alterations provoked by phenylalanine, suggesting that altered energy metabolism may be important in the pathophysiology of maternal PKU. If these alterations also occur in maternal PKU, it is possible that pyruvate and creatine supplementation to the phenylalanine-restricted diet might be beneficial to the children born from phenylketonuric mothers.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: adenosina difosfato

AK: adenilato-cinase

AMP: adenosina monofosfato

ATP: adenosina trifosfato

BH₄: tetraidrobiopterina

CK: creatina-cinase

EEG: eletroencefalograma

EIM: erro inato do metabolismo

HPA: hiperfenilalaninemia

L-DOPA: levodopa

LNAA: aminoácidos neutros (*large neutral amino acids*)

L-Phe: L-fenilalanina

MRI: imagens por ressonância magnética (*magnetic resonance imaging*)

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

PAH: fenilalanina-hidroxilase

PAL: fenilalanina-amônia-liase

PCr: fosfocreatina

PEP: fosfoenolpiruvato

Phe: fenilalanina

PKU: fenilcetonúria

PK: piruvato-cinase

SNC: sistema nervoso central

TCA: ciclo dos ácidos tricarbóxicos (*tricarboxylic acid cycle*)

Tyr: tirosina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: fenilalanina-hidroxilase – pág. 15

Figura 2: catabolismo da fenilalanina – pág. 16

Figura 3: modelo do sistema PCr/CK – pág. 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: percentual de gestações em mulheres portadoras de fenilcetonúria ou hiperfenilalaninemia afetadas com complicações da síndrome da fenilcetonúria materna, agrupadas por níveis séricos de Phe – pág. 25

1. INTRODUÇÃO

1.1. Erros inatos do metabolismo

O termo “erro inato do metabolismo” foi cunhado pelo médico inglês Archibald Garrod em 1908. Especialista no estudo de doenças hereditárias do metabolismo, ele formulou a hipótese de que os genes seriam responsáveis pela produção das enzimas, hipótese esta descrita no livro clássico *Inborn Errors of Metabolism*, de 1909. Garrod observou em seus pacientes que doenças como a alcaptonúria, cistinúria, pentosúria e albinismo ocorriam em vários membros de uma mesma família e que os casos eram mais frequentes tratando-se de filhos de pais consanguíneos, mesmo que estes não apresentassem a doença. Com base nas leis de Mendel o conjunto de observações levou-o a propor um modelo de herança autossômica recessiva (Scriver 2001). É válido ressaltar que a relação entre os aspectos bioquímicos e genéticos pode ser mais bem esclarecida apenas em 1941, quando Beadle et al. propuseram a hipótese “um gene - uma enzima”, considerando que todos os processos bioquímicos do organismo ocorrem sob controle gênico e, portanto, mutações gênicas levariam a rotas bioquímicas deficientes (Beadle et al. 1941).

Em grande parte são doenças que afetam todo o organismo e podem se manifestar em qualquer faixa etária. Quanto à sintomatologia e manifestações clínicas, estas podem ser variadas e inespecíficas nos indivíduos conforme a rota metabólica envolvida e o tecido afetado. Os sintomas variam desde brandos ou nulos até graves e incapacitantes, podendo levar à morte neonatal ou a sérios prejuízos ao sistema nervoso central (SNC), sendo que alterações do desenvolvimento do SNC constituem os aspectos clínicos mais comuns nos EIM (Illsinger et al. 2010, Gropman 2012).

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são um grupo fenotípica e geneticamente heterogêneo de desordens causadas por um defeito em uma via metabólica, levando ao mau

funcionamento do metabolismo de determinado substrato e/ou à acumulação de metabolitos intermediários tóxicos. Até o momento, mais de 1000 EIM diferentes foram identificados. Embora individualmente raros, a incidência cumulativa dos EIM tem demonstrado ser de aproximadamente 1 em 800 nascidos vivos. Os EIM estão presentes em todos os grupos étnicos e em todas as épocas e representa cerca de 10% de todas as doenças genéticas (Mak et al. 2013).

1.2. Fenilcetonúria e Hiperfenilalaninemia

1.2.1. Histórico

A fenilcetonúria foi a primeira doença metabólica hereditária da qual o background bioquímico foi compreendido e tratamento foi disponibilizado. A incidência desse erro inato do metabolismo de aminoácidos é de aproximadamente 1 em cada 10.000 nascidos vivos.

Em 1934, Fölling mostrou que dois irmãos com idades entre 4 e 7 anos com retardo mental grave excretavam grandes quantidades de corpos fenilcetônicos através da urina (van Spronsen 2010). Ele chamou a condição de “oligofrenia fenilpirúvica”, não muito tempo depois renomeando a condição como “fenilcetonúria”, alusão ao subproduto incomum encontrado na urina (Scriver 2007). O método de Fölling consistia de um teste usando cloreto férrico, ocorrendo mudança de coloração quando na presença de corpos fenilcetônicos (Folling et al. 1958). Na época, testes utilizando esse método foram realizados em outras crianças com retardo mental, dentre as quais 8 revelaram casos semelhantes ao dos irmãos estudados por Fölling (Scriver 2007). Hipotetizando uma associação entre retardo mental e a excreção de fenilpiruvato na urina, Fölling denominou a desordem de “imbecilidade fenilpirúvica” (Penrose et al. 1937).

Nas próximas duas décadas, os pesquisadores descobriram que a atividade da enzima fenilalanina hidroxilase hepática (PAH), que catalisa a conversão de fenilalanina em tirosina, é deficiente na fenilcetonúria, e que esta deficiência resulta em concentrações muito elevadas de fenilalanina no sangue e tecidos de indivíduos afetados por essa desordem metabólica, chegando a níveis tóxicos para o cérebro (van Spronsen 2010). O defeito metabólico foi detectado por Jervis, em 1947, que mostrou que a Phe proveniente da dieta não era convertida em tirosina (Tyr) nos pacientes afetados pela desordem (Jervis 1947). Já o sistema enzimático foi descrito em 1952 por Udenfriend e Cooper (Udenfriend et al. 1952). Também foi demonstrado que o fenótipo metabólico PKU pode ser tratado por meio de restrição dietética de fenilalanina, com o potencial de prevenir o retardo mental (Bickel 1954, Bickel et al. 1954).

Um grande avanço no tratamento da fenilcetonúria ocorreu com a restrição da ingestão de Phe, o que não só diminuiu a concentração de fenilalanina no sangue, mas também promoveu melhoras no quadro clínico apresentado pelos pacientes PKU. Este efeito substancial de restrição alimentar é devido ao fato de que Phe é um aminoácido essencial, esta não é sintetizada no organismo humano e, portanto, a concentração da Phe no sangue é determinada principalmente pela ingestão e o equilíbrio entre a síntese de proteínas e catabolismo (van Spronsen 2010).

Na década de 1960, o pediatra canadense Robert Guthrie desenvolve um teste de laboratório simples, compatível com a realização de triagem populacional em recém-nascidos (Guthrie et al. 1963). Logo surgiram programas de triagem neonatal, implantados em todo o mundo, com o objetivo de diagnosticar precocemente e tratar pacientes portadores de PKU, evitando o retardo mental. A PKU tornou-se um protótipo para triagem genética em populações humanas (Thalhammer 1975). No Brasil, a triagem neonatal teve início em 1976, quando o Prof. Benjamin Schmidt criou o projeto pioneiro de triagem neonatal para

fenilcetonúria na Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de São Paulo (APAE-SP) (de Carvalho et al. 2007).

Em 1963 um estudo realizado por Kaufman demonstrou a participação do cofator tetraidrobiopterina (BH₄) na reação catalisada por PAH (Kaufman 1963), o que abriu caminho para o estudo de outras formas de acumulação de fenilalanina, estas inicialmente chamadas de “hiperfenilalaninemia (HPA) maligna” (Danks et al. 1978). A descoberta de uma nova forma de PKU revelou desordens tanto na síntese como na reciclagem de BH₄.

Nos anos 1980 o gene codificador de PAH foi clonado e mapeado no cromossomo 12, e a sequência genômica da fenilalanina-hidroxilase humana foi determinada (Lichter-Konecki et al. 1988).

Em 1996 foi estabelecido o *PAH Mutation Analysis Consortium Database*, realizando análises de mutação em pacientes PKU de diversas populações humanas (Hoang et al. 1996). Ainda nos anos 1990, a enzima PAH foi cristalizada e sua estrutura molecular descrita, tornando a modelagem molecular das mutações possível (Erlandsen et al. 1999).

Os estudos mais recentes na terapêutica da PKU consideram o uso da enzima exógena fenilalanina-amônia-liase (PAL), que promove a depleção de Phe através de uma reação que produz amônia, porém em níveis não ameaçadores para o SNC, e terapia gênica, tendo como alvo promover a conformação correta de PAH, uma vez que se sabe que grande parte da disfunção da enzima se deve a um defeito na etapa de conformação tridimensional na síntese da mesma (van Spronsen 2010).

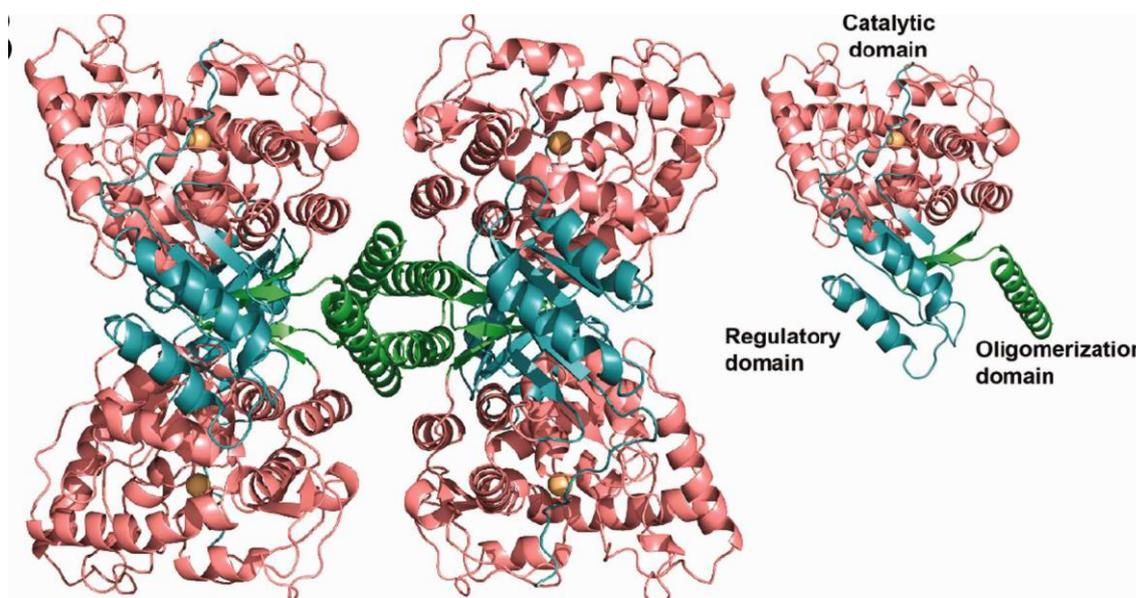
1.2.2. Deficiência de fenilalanina-hidroxilase e classificação das hiperfenilalaninemias

1.2.2.1 Fenilalanina-hidroxilase

O gene da fenilalanina-hidroxilase humana está localizado no cromossomo 12q23.2, contém aproximadamente 171kb e 13 éxons. O DNA funcional contém aproximadamente 2,4

kb e codifica a síntese de um peptídeo de 452 aminoácidos, cuja sequência é quase idêntica à da PAH, indicando uma pequena modificação pós-traducional (Lidsky et al. 1985). HPA humana pode ser causada por mais de 500 mutações do “locus” na PAH, que resultam na PKU, ou por várias mutações em outros “loci” que afetam a síntese e regeneração de BH_4 , resultando em uma HPA não PKU (Scriver CR 2001). Estruturalmente, a PAH é uma enzima tetramérica formada por subunidades de 50kDa. Cada subunidade é composta de um domínio N-terminal regulador, um domínio central catalítico e um domínio C-terminal de oligomerização (Figura 1) (Fusetti et al. 1998, Kobe et al. 1999).

Figura 1: Estrutura tridimensional da fenilalanina-hidroxilase

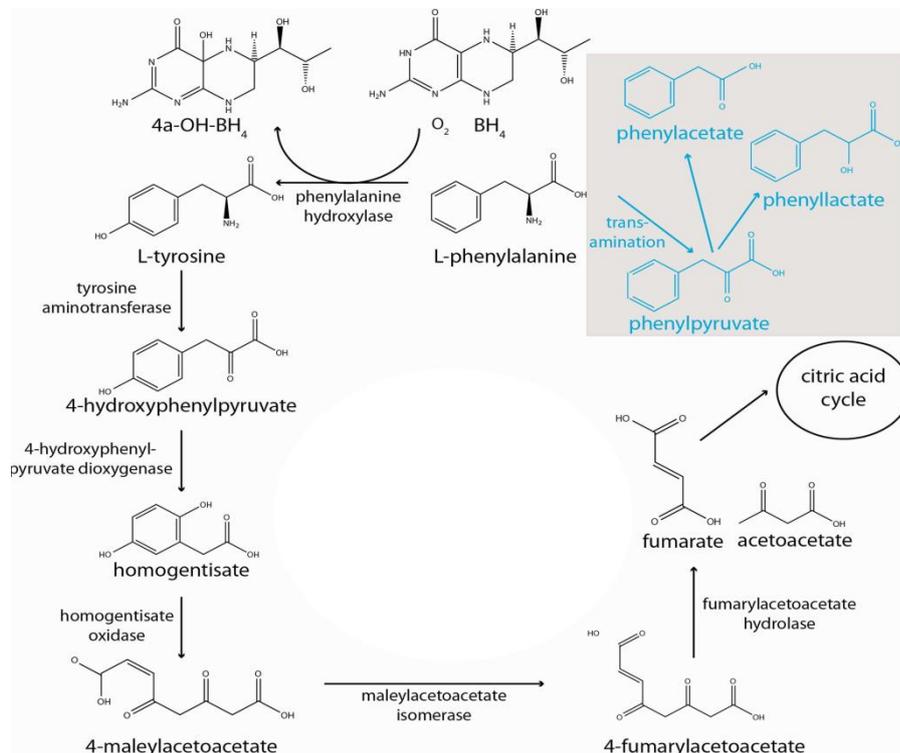


Adaptado de Flydal and Martinez, 2013.

A PAH é a enzima que catalisa a conversão de Phe a Tyr através de uma reação de para-hidroxilação da cadeia lateral aromática de Phe. Nos mamíferos, esta reação dependente de BH_4 é o passo inicial e limitante na degradação do excesso de Phe proveniente de proteínas na dieta, no qual a Tyr é degradada a produtos que são metabolizados no ciclo dos ácidos

tricarboxílicos (TCA) (Flydal et al. 2013). O metabolismo alternativo de Phe por descarboxilação ou transaminação produz vários metabólitos que são excretados na urina (Figura 2) (Scriver CR 2001).

Figura 2: Reação da fenilalanina-hidroxilase e o completo catabolismo de fenilalanina



Rota em preto: catabolismo de Phe; em azul: metabolismo anormal de Phe na PKU. Adaptado de Flydal and Martinez, 2013.

A L-fenilalanina (L-Phe) é um aminoácido nutricionalmente essencial e indispensável à síntese proteica em tecidos de mamíferos. Normalmente, 75% da Phe é convertida em Tyr por hidroxilação e 25% é incorporada a proteínas (McGee et al. 1972). Para alcançar este duplo papel de conservar as quantidades necessárias à síntese proteica e remover o excesso de L-Phe, a PAH de mamíferos desenvolveu vários mecanismos de regulação e uma estrutura

específica através da qual as propriedades reguladoras são exercidas através de fosforilação, cofator BH₄ e Phe (Flydal et al. 2013).

O cofator BH₄ exerce um efeito regulador inibitório sobre PAH, que se manifesta como uma estabilização de um estado tenso (T), por sua vez revertido por ativação promovida por L-Phe. A atividade da PAH, quando analisada na presença de BH₄, pode ser observada através de incubação com L-Phe, respondendo com cooperatividade positiva com o aumento das concentrações de substrato. A necessidade de finos ajustes conformacionais para a ativação alostérica de PAH por Phe pode ser observada pelo declínio de cooperatividade positiva utilizando o mesmo ensaio, porém empregando enzimas PAH mutantes, associadas à PKU, que ainda mantêm a estrutura tetramérica (Fusetti et al. 1998). Os modelos atuais para explicar a regulação alostérica positiva através de L-Phe descrevem a transição do estado T, menos ativo e com baixa afinidade para o ligante, para um estado relaxado (R), mais ativo e de alta afinidade pelo ligante. O mecanismo desta ativação ainda não é compreendido e não há consenso se esta é causada pela ligação de L-Phe em um sítio alostérico no domínio regulador ou no próprio sítio ativo. A fosforilação de PAH, estimulada por glucagon através da ativação de proteínas cinases dependentes de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), aumenta a afinidade da enzima por L-Phe e então ativa PAH em sinergismo com a ativação promovida por L-Phe (Flydal et al. 2013).

1.2.2.2. Classificação das hiperfenilalaninemias

Não existe padronização em relação à classificação das HPA, variando conforme o local (Blau et al. 2010). Em geral, elas podem ser divididas em HPA-PKU e não PKU. Existem diversas formas de se fazer esta classificação, as mais utilizadas levando em consideração os níveis de Phe sanguíneos no momento do diagnóstico, em vigência de dieta normal (Levy et al. 2007), ou a atividade residual de PAH, medida através de biópsia do

fígado dos pacientes. Atividades residuais de até aproximadamente 1% são compatíveis com PKU clássica, ao passo que em torno de 35% de atividade enzimática é classificada como HPA não PKU (Blau et al. 2003). Neste trabalho considerou-se a classificação feita com base nas concentrações plasmáticas de Phe, como segue:

a) Hiperfenilalaninemia não PKU: condição na qual os níveis de Phe no sangue permanecem entre 2 e 6 mg/dl (120 – 360 μ mol/l) em dieta normal, sem prejuízo ao paciente;

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

c) Fenilcetonúria atípica: os níveis de Phe plasmáticos ficam em torno de 6 a 20 mg/dl (360 – 1200 μ mol/l);

d) Fenilcetonúria clássica: condição causada pela deficiência da PAH na qual os níveis plasmáticos de Phe são comumente superiores a 20 mg/dl (1200 μ mol/l)(Scriver CR 2001).

A fenilcetonúria materna é uma síndrome teratogênica considerada à parte, dada suas particularidades que implicam consequências ao feto, e não à mãe portadora de PKU (Levy 2003).

1.2.2.3. Aspectos clínicos e fisiológicos

Os pacientes fenilcetonúricos são normais ao nascimento, contudo, em casos não diagnosticados ao nascimento, os problemas neurológicos surgem nos primeiros meses de vida em decorrência da dieta inadequada. A deficiência de PAH não tratada apresenta-se clinicamente como um grupo de sintomas variável, entre eles: microcefalia, anormalidades vistas em eletroencefalograma (EEG) e em imagens de ressonância magnética (MRI), eczema, dificuldades motoras e de comunicação, hipopigmentação dérmica, atraso do

desenvolvimento psicomotor, convulsões, hiperatividade, baixos escores em testes de QI e em testes de atenção, agressividade, hipotonia muscular, tremores, hipoplasia dentária, descalcificação de ossos longos e retardo do crescimento. O quadro clínico é inespecífico e o conjunto de sinais particulares de cada caso estando diretamente relacionado às concentrações sanguíneas de Phe (Anastasoiaie et al. 2008, Hartnett et al. 2013).

Em uma avaliação clínica completa distúrbios emocionais e comportamentais também devem ser considerados. Problemas como ansiedade, depressão e isolamento social vêm sendo relatados em pacientes PKU e, talvez, exista alguma relação entre estes e a deficiência de PAH (Cappelletti et al. 2013).

Do ponto de vista fisiopatológico, as elevações de Phe provavelmente não causam diretamente os sintomas psiquiátricos; há três mecanismos possíveis através dos quais níveis elevados de Phe afetam indiretamente as funções cerebrais, incluindo anormalidades na formação da mielina, competição no transporte de aminoácidos através da barreira hematoencefálica, e reduções de neurotransmissores (Huttenlocher 2000, Surtees et al. 2000).

Em termos de anormalidades de mielina, o excesso de Phe pode inibir o desenvolvimento da mielina. Imagens de ressonância magnética (MRI) documentam uma associação entre níveis elevados de Phe e redução de mielina. Embora o mecanismo pelo qual Phe afeta mielina não esteja claro, a mielinização apresenta-se atrasada em crianças com PKU não tratadas, e ocorre desmielinização em adultos PKU que interrompem o tratamento dietético (Scarabino et al. 2009).

A Phe compartilha de um sistema de transporte através da barreira hemato-encefálica comum a outros aminoácidos essenciais. Quando Phe está elevada, quantidades normais de outros aminoácidos, tais como tirosina e triptofano, não conseguem chegar ao cérebro. A tirosina e o triptofano são precursores de neurotransmissores, dopamina e serotonina,

respectivamente, e conseqüentemente ocorre prejuízo na síntese destes (Pardridge et al. 1986, Burlina et al. 2000).

Além da perturbação da homeostase de neurotransmissores, evidências sugerem que os níveis elevados de Phe interferem no metabolismo energético cerebral. Ainda não está claro se o impacto de elevações de Phe no metabolismo energético cerebral contribui para os graves distúrbios de desenvolvimento do SNC em indivíduos com fenilcetonúria não tratada. No entanto, tais achados estimulam novas tentativas de investigar o papel do metabolismo energético na fisiopatologia da PKU (Pietz et al. 2003).

1.2.2.4. Diagnóstico e tratamento

Atualmente, para quase todos os pacientes com PKU, o diagnóstico e o início do tratamento resultam da triagem neonatal, não da observação de sintomas clínicos. O teste do pezinho em recém-nascidos detecta PKU, possibilitando iniciar o tratamento dietético antes de 10-14 dias de idade, antes que sintomas clínicos apareçam (van Spronsen 2010). O diagnóstico das HPAs é feito com base na elevada concentração sanguínea de Phe em repetidas amostras de sangue. O limite superior de referência para Phe em sangue total ou plasma é menor que 150 $\mu\text{mol/l}$ e levemente menor, 120 $\mu\text{mol/l}$, em crianças mais velhas. O diagnóstico pode ser confirmado pela determinação fluorimétrica de Phe no soro ou ainda por cromatografia de troca iônica através de analisadores de aminoácidos ou por cromatografia líquida de alta eficiência. Quando o paciente não responde bem a restrição dietética de Phe, deve-se realizar o diagnóstico diferencial para desordens de síntese e reciclagem de BH_4 . Os pacientes que têm uma deficiência de BH_4 normalmente não necessitam de uma dieta restrita em Phe, mas ao invés disso requerem a administração oral de BH_4 , levodopa (L-DOPA) e de

5-hidroxitriptofano e têm, em geral, um prognóstico que é pior que o de fenilcetonúria clássica, mesmo quando o diagnóstico é precoce e o tratamento é correto (Zurfluh et al. 2005).

Atualmente o tratamento dietético deve atender aos seguintes níveis de Phe no sangue: do nascimento aos 8 anos de idade, recomenda-se que Phe permaneça entre 100 e 350 $\mu\text{mol/l}$ e a partir de então os níveis devem ser mantidos abaixo de 700 $\mu\text{mol/l}$ (van Spronsen et al. 2010).

Na prática, a adesão à dieta é complicada. Phe é um aminoácido que está presente em praticamente todas as proteínas existentes naturalmente. Não poder consumir qualquer tipo de carne, peixe, leite, queijo, ovos, nozes, sementes, alimentos com farinha, soja ou tofu é socialmente difícil, bem como a proibição de consumir legumes ricos em proteínas sem prévio cálculo da concentração de Phe ou a carga de proteína natural presentes nesses alimentos. Mesmo quando os pacientes se tornam adultos, alguns ainda necessitam de equilibrar o consumo de proteínas naturais (Lammardo et al. 2013).

Os indivíduos com PKU são fortemente aconselhados a consumir os substitutos de proteína pelo menos três vezes por dia. Entretanto, apesar da evolução no que diz respeito a sabor e aroma, essas misturas fabricadas quimicamente nunca irão atingir o status de comida “normal” (Lammardo et al. 2013).

Nos últimos anos, novas estratégias de tratamento têm surgido ou estão sendo desenvolvidas, incluindo suplementos alimentícios mais palatáveis, glicomacropéptídeos (Ney et al. 2009) e utilização de aminoácidos neutros (LNAA) (van Spronsen et al. 2010). Além disso, há ensaios clínicos de uma abordagem terapêutica enzimática envolvendo a fenilalanina-amônia-liase (PAL) e estudos pré-clínicos em terapia genética com chaperonas em andamento. Estas novas estratégias terapêuticas têm como alvo a Phe ingerida quando esta chega ao trato intestinal, no caso da PAL, ou promover a conformação adequada de PAH com

chaperonas farmacológicas, com potencial para melhorar ainda mais a evolução do tratamento da fenilcetonúria (Sarkissian et al. 2005, Underhaug et al. 2012).

1.3. Fenilcetonúria e hiperfenilalaninemia materna

Graças à triagem de rotina pós-natal para a fenilcetonúria mais casos desta doença têm sido descobertos e tratados (Guthrie et al. 1963, Matalon et al. 1991). Desde então, a deficiência intelectual tem sido prevenida em um número substancial de pacientes. Conseqüentemente, um número crescente de mulheres com diagnóstico de fenilcetonúria ou hiperfenilalaninemia chega à idade reprodutiva com desenvolvimento intelectual e social comparável ao de pessoas não portadoras de HPA/PKU (Radomyska 2003, Chien et al. 2004). Entretanto, porque apenas poucos efeitos indesejáveis devidos a elevadas concentrações de fenilalanina persistem após a adolescência, muitas mulheres não continuam sua dieta (Potocnik et al. 1994, Burgard 2000). Este problema é há muito reconhecido (Hyanek et al. 1979), bem como a importância do tratamento pré-natal em prevenir danos ao feto (Matalon et al. 1986). No entanto, as conquistas ainda ficam aquém das expectativas, já que ainda é preciso aprender a identificar, orientar e tratar de mães portadoras de HPA, de forma a proteger o feto em risco (Kirkman 1982, Campbell et al. 2003).

A observação de retardo mental em cinco filhos de uma mulher com diagnóstico de fenilcetonúria mal controlada (PKU) foi o primeiro relato da hipótese de que o metabolismo anormal da fenilalanina durante a gravidez poderia levar a deficiência de desenvolvimento em proles não portadoras de PKU. A condição apresentada por crianças nascidas de mulheres com PKU mal controlada recebeu a confusa denominação de PKU materna, embora aplique-se à criança. Estudos subsequentes mostraram claramente a relação entre níveis de

fenilalanina persistentemente elevados no plasma de mães e as anomalias congênitas e deficiência de desenvolvimento resultante na prole (Andersson 2013).

Malformações congênitas são conhecidas por resultar de influências genéticas ou ambientais ou, ainda, uma combinação destes fatores, chamada determinação multifatorial. Malformações podem ser únicas ou múltiplas e podem ser graves ou leves. Anomalias menores podem ser por vezes consideradas sem significado clínico, no entanto, sua presença é alerta para se procurar identificar anomalias mais graves. Acredita-se que o efeito de qualquer teratogênico esteja intimamente relacionado com o tempo e grau de exposição durante períodos críticos do desenvolvimento embrionário. Embora períodos específicos da gestação possam refletir o momento mais sensível para um determinado sistema, o desenvolvimento estrutural e funcional pode se estender bem além do período crítico. É de se esperar que os efeitos sobre alguns sistemas possam se acumular por toda a gravidez.

Os erros inatos do metabolismo podem interagir nos processos de reprodução humana (Radomyska 2003, Brassier et al. 2012) de diversas maneiras: a) podem causar infertilidade, b) a gravidez pode afetar o controle metabólico materno, c) um defeito metabólico fetal pode afetar a gravidez, e d) um fenótipo metabólico materno pode afetar o desenvolvimento fetal. A hiperfenilalaninemia pertence a este último grupo.

A HPA materna é nociva ao embrião e ao feto porque é uma forma de teratogênese metabólica (Leonard 1986) e, como tal, parece-se com a síndrome alcoólica fetal (Costa et al. 2002) e tem efeitos semelhantes àqueles provocados pelo diabetes mellitus materno.

A HPA ou PKU materna não tratada durante a gravidez pode levar à chamada síndrome de fenilcetonúria materna no recém-nascido. Esta síndrome consiste de baixo peso ao nascimento, microcefalia, doença cardíaca congênita, deficiência intelectual ou de desenvolvimento mental e dismorfismo facial (Rouse et al. 2000). A realização de ultrasonografia fetal no primeiro trimestre irá detectar a idade gestacional e determinar se a

gravidez é viável, além de aspectos relevantes para o aconselhamento e tratamento da gestante; no segundo trimestre é possível detectar doença cardíaca congênita, mas não microcefalia (Levy et al. 1996). A HPA materna pode causar hipoplasia do corpo caloso no feto, mas as alterações na substância branca cerebral vistas na PKU pós-natal estão ausentes (Levy et al. 1996).

Para uma melhor compreensão das anomalias presentes na síndrome da fenilcetonúria materna é importante esclarecer alguns parâmetros utilizados na identificação de características relacionadas à teratogênese: é considerado como baixo peso ao nascer o limite < 2,5 kg; microcefalia é definida como um perímetro cefálico ≤ 32 cm; é considerado retardo mental um QI abaixo de 80; aborto espontâneo é definido como interrupção espontânea de gravidez no primeiro trimestre e dismorfia facial refere-se a anomalias faciais do nariz, testa, mandíbula, palato ou olhos. (Prick et al. 2012).

Não há dúvida de que a HPA materna não tratada é um perigo global para o feto, no entanto há limites para efeitos particulares: um limiar de 900 $\mu\text{M/l}$ para doença cardíaca congênita e um possível limite no nível de 400 $\mu\text{M/l}$ para redução do desenvolvimento cognitivo (Levy et al. 1994). Por outro lado, parece haver um efeito dose-dependente linear sobre a circunferência da cabeça começando com as menores elevações de fenilalanina no sangue materno (Drogari et al. 1987). Um estudo realizado levando em consideração com 524 gestações de 155 mulheres portadoras de HPA correlacionou os níveis de fenilalanina maternos com as anomalias presentes nos recém-nascidos (Tabela 1). Filhos de mulheres que mantiveram os níveis de Phe abaixo de 600 $\mu\text{mol/l}$ apresentaram taxas de doença cardíaca congênita, microcefalia, e baixo peso ao nascer significativamente inferiores às observadas em indivíduos nascidos de gestações nas quais os níveis de Phe materno não foram controlados (Lenke et al. 1980).

Essas anormalidades observadas na prole de mulheres portadoras de HPA ou PKU estão relacionadas não somente aos níveis plasmáticos de Phe, mas, como mencionado anteriormente, aos períodos gestacionais em que os níveis de Phe encontram-se exacerbados (Lee et al. 2005, Prick et al. 2012). O período crítico para o desenvolvimento do sistema nervoso central, crânio e coração é de 5 a 8 semanas do último período menstrual da mãe. Conseqüentemente, se uma mulher grávida com PKU não está controlando sua dieta antes da quinta semana, os níveis de Phe no sangue estão aumentados, atravessam a placenta e entram na circulação do feto (Rimoin et al. 2007).

Tabela 1: Percentual de gestações em mulheres portadoras de fenilcetonúria ou hiperfenilalaninemia afetadas com complicações da síndrome da fenilcetonúria materna, agrupadas por níveis séricos de Phe

| | Nível materno de Phe ($\mu\text{mol/l}$) | | | |
|---------------------------|--|-------------------|------------------|------------------|
| | ≥ 1200 | 901 – 1199 | 601 - 900 | 180 - 600 |
| Complicações | | | | |
| Retardo Mental | 92 | 73 | 22 | 21 |
| Microcefalia | 73 | 68 | 35 | 24 |
| Doença cardíaca congênita | 12 | 15 | 6 | 0 |
| Peso ao nascer < 2,5 Kg | 40 | 52 | 56 | 13 |
| Aborto espontâneo | 24 | 30 | 18 | 8 |

Adaptado de Lenke and Levy, 1980.

1.3.1. Patogênese da Síndrome da Fenilcetonúria Materna

As hipóteses a respeito da patogênese envolvida na fenilcetonúria materna concentraram-se no transporte placentário de aminoácidos. Alguns dados indicam que a fenilalanina compartilha o sistema de transporte ativo placentário utilizado por aminoácidos neutros (Kudo et al. 1990). Existem poucas evidências experimentais quanto ao transporte placentário de aminoácidos; sabe-se que, durante a gravidez, a placenta seleciona naturalmente as concentrações mais elevadas de aminoácidos, incluindo Phe. Assim, os níveis de Phe são amplificados (1,5 a 2 vezes), o que multiplica os efeitos teratogênicos no feto em desenvolvimento (Rimoin et al. 2007).

Um excesso de fenilalanina é prejudicial para o embrião, provavelmente através dos mesmos mecanismos que tal excesso torna prejudicial para o sistema nervoso central do ser humano em desenvolvimento pós-natal. O efeito da fenilalanina no feto é totalmente dependente da HPA materna e seu transporte através da placenta; o feto parece não ter capacidade de alterar o nível de fenilalanina, apesar das evidências *in vitro* da atividade PAH quase completa logo na décima terceira semana de gestação. Isso explica a falta de uma diferença de efeito teratogênico entre o feto com PKU e o feto heterozigoto não PKU (Scriver CR 2001).

Estudos sugerem que os efeitos danosos ao feto provocados por altos níveis de Phe não se devem à acumulação de metabolitos derivados da própria fenilalanina (Gardiner 1990), já que esses seriam aparentemente inofensivos para o feto (Dorland et al. 1993). Entre os prováveis mecanismos para o efeito está a concorrência entre a fenilalanina e outros aminoácidos para absorção pelos tecidos fetais e, talvez, pela placenta. Entretanto, há pesquisas afirmando o oposto, que o agente tóxico na fenilcetonúria materna é provavelmente um metabolito de fenilalanina, tal como o ácido fenilacético ou feniletilamina, ou ainda a combinação de metabolitos de fenilalanina, ao invés de somente fenilalanina (Loo et al. 1983, Denno et al. 1990).

A despeito de tal controvérsia, é importante considerar a hipótese que explica a toxicidade dos altos níveis de Phe para o feto em desenvolvimento através da competição por transportadores; quando há altas concentrações de Phe esta satura os transportadores, os mesmos utilizados pelos aminoácidos neutros, já que estes estão presentes em concentrações normais. Assim, a patogenia pode ocorrer pela toxicidade direta da fenilalanina, e/ou pela falta de aminoácidos neutros participando da origem das alterações na prole de mães fenilcetonúricas (van Spronsen et al. 2009).

Outra ideia sobre patogênese da síndrome da PKU materna deve ser mencionada. Tal hipótese argumenta ser a privação de tirosina, ao invés de excesso de fenilalanina, o evento patogênico mais importante na PKU (Bessman 1998), uma vez que há deficiência ou ausência da hidroxilação de fenilalanina à tirosina. No entanto, não há muitas evidências dessa teoria quando se trata de PKU materna (Rohr et al. 1998). De qualquer forma, o objetivo principal na gestão da gravidez de mulheres portadoras de HPA ou PKU continua sendo a manutenção de níveis seguros de Phe no plasma.

Diversos modelos experimentais têm sido realizados para estudar a patogênese da HPA materna (Brass et al. 1982, Loo et al. 1983, Kirby et al. 1990), mas muitos destes utilizam manipulações farmacológicas que incluem inibidores da fenilalanina hidroxilase combinados com sobrecarga de fenilalanina para induzir HPA materna. Se os inibidores podem atingir o feto, o seu próprio efeito não pode ser dissociado do efeito de fenilalanina sozinha. Portanto, o modelo mais adequado emprega linhagens de ratos com deficiência de PAH (Cho et al. 2001), nos quais o efeito do nível de fenilalanina materno pode ser manipulado através da sobrecarga de Phe, eliminando a interferência de inibidores.

1.3.2. Cuidados na Gestação Hiperfenilalaninêmica

A fenilalanina é transportada através da placenta e resulta em níveis fetais que são mais altos do que os níveis sanguíneos maternos. Dados atuais recomendam como meta níveis Phe maternos de 60-360 $\mu\text{mol/l}$, apesar de recomendações internacionais aconselharem a manutenção de Phe < 240 $\mu\text{mol/l}$. Embora estudos tenham mostrado que níveis de Phe de até 100 $\mu\text{mol/l}$ sejam seguros durante a gestação, há preocupações de que níveis persistentemente baixos de Phe materna, especialmente durante o segundo e terceiro trimestres de gravidez, possam estar associados a um risco aumentado de retardo no crescimento intrauterino (Teissier et al. 2012). Os efeitos adversos de níveis aumentados de Phe no feto em desenvolvimento requerem atenção redobrada e intervenções durante a gestação, com ênfase no controle pré-natal. Mulheres que engravidam sem controle adequado de Phe precisarão de cuidados significativos para atingir níveis Phe dentro da faixa terapêutica recomendada em tempo hábil. Isto pode exigir a intervenção intensiva, incluindo a internação hospitalar, para iniciar o controle dietético (Brown et al. 2002).

Nem todos os medicamentos e suplementos dietéticos disponíveis para utilização em indivíduos com deficiência de PAH são adequados para utilização durante a gravidez. Especificamente, aminoácidos neutros não são recomendados, já que eles não alteram os níveis de Phe maternos de forma consistente (Austic et al. 1999).

Todos os cuidados pré-natais de rotina são recomendados para mulheres com deficiência de PAH. Os níveis maternos de Phe elevados não afetam os valores para os testes de triagem de rotina para outras condições. O crescimento fetal deve ser monitorado ao longo da gestação. A determinação precoce da idade gestacional, usando o ultrassom, é recomendada devido a preocupações quanto ao desenvolvimento intrauterino e à possibilidade de microcefalia. Um ultrassom de rastreamento para anomalias fetais também é recomendado. Uma ecocardiografia fetal deve ser realizada entre 18 e 22 semanas de gestação (Vockley et al. 2014).

Os requisitos maternos de Phe mudam significativamente ao longo da gestação, necessitando de testes frequentes e de ajustes na dieta. O excesso de restrição dietética deve ser evitado. A ingestão inadequada de proteínas e calorias pode contribuir para o aumento dos níveis Phe maternos. Deve-se controlar a ingestão de vitaminas e minerais na forma de vitaminas pré-natais convencionais, já que os suplementos alimentícios empregados no tratamento de deficiência de PAH podem fornecer um excesso de vitamina A, que é associado com defeitos congênitos. A diminuição da ingestão de vitamina B12 pode contribuir para um aumento do risco de doença cardíaca congênita (Matalon et al. 2003).

As necessidades de Phe materna diminuem após o parto em relação às exigências anabólicas aumentadas no terceiro trimestre, e o cuidado metabólico e acompanhamento nutricional deve continuar. A utilização de suplementos alimentares pode proporcionar o aumento de calorias e proteínas necessárias para suportar a amamentação (640 kcal/dia e 25 g de proteína/dia). Não existem contraindicações para a amamentação, pois as crianças não afetadas pela deficiência de PAH são capazes de metabolizar os níveis Phe ligeiramente mais elevados no leite materno de sua mãe, sem dificuldades (Vockley et al. 2014).

1.4. Cérebro e metabolismo energético

O cérebro é o terceiro órgão em consumo energético no corpo humano, ficando abaixo, em termos de consumo de energia, somente de músculo e fígado. Sob condições fisiológicas normais, o cérebro obtém a maior parte da energia que consome a partir da glicose e seus precursores, como glicogênio (Gruetter 2003). Enquanto as necessidades metabólicas da maioria dos órgãos do corpo estão intimamente associadas ao tamanho do corpo, de tal modo que o gasto metabólico relativo de cada órgão depende do seu tamanho relativo, as necessidades metabólicas de cérebros de mamíferos são variáveis: excluindo seres

humanos, o gasto energético relativo do cérebro de vertebrados varia entre 2 e 10% de toda a energia empregada pelo organismo. Isto se atribui, em parte, à grande variação no tamanho relativo do cérebro entre espécies diferentes, e em parte à elevada atividade metabólica do cérebro, independentemente do estado comportamental do animal. Em contraste, o cérebro humano, que corresponde a 2% da massa corporal, consome cerca de 20% de toda a energia do corpo (Herculano-Houzel 2011). Com tais considerações, é plausível assumir que o metabolismo energético desempenha um importante papel na formação e desenvolvimento do cérebro, além de ser fundamental na manutenção da integridade e funções cerebrais (Zhu et al. 2012).

1.4.1. Creatina-cinase

A creatina é um ácido orgânico de guanidina cujo principal objetivo é receber um grupamento fosfato a partir de adenosina trifosfato (ATP) mitocondrial e transferir para um ADP no citosol. Isto ocorre por meio de uma reação de fosforil transferência reversível catalisada pela creatina-cinase (CK) segundo a reação: Creatina + ATP \leftrightarrow Fosfocreatina (PCr) + Adenosina difosfato (ADP). Tal reação é definida como sistema PCr/Ck (Lowe et al. 2013), e exerce um papel chave no metabolismo energético celular de tecidos que possuem alta e flutuante demanda de energia, como músculo cardíaco e esquelético e cérebro.

Duas isoformas de CK podem ser exibidas dentro de uma célula – a forma citosólica (CKcit) e a forma mitocondrial (CKmit). Geralmente as isoformas citosólica e mitocondrial são co-expressas em tecidos específicos dentro de compartimentos subcelulares onde a energia liberada é captada (glicólise e mitocôndria) ou utilizada (ATPases e cinases no citosol), sendo ligadas funcional ou estruturalmente pelo sistema PCr/CK (Figura 3). Esse

sistema de relação das diferentes isoformas de CK com as razões ATP/ADP e Cr/PCr permite a distribuição intracelular de energia (Wallimann et al. 1992).

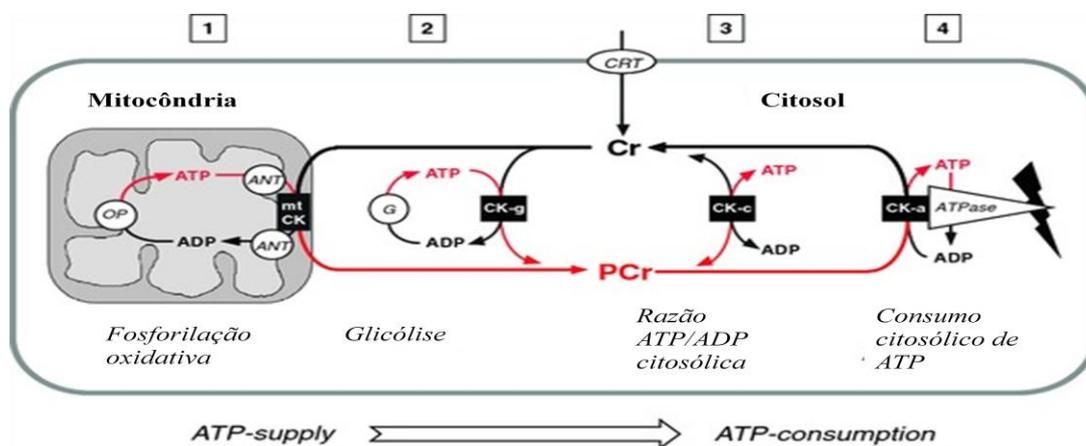


Figura 3: Modelo do sistema PCr/CK em tecidos de alta demanda energética (Adaptado de Wallimann, 2011).

Muitas funções são atribuídas ao sistema PCr/CK. Dentre as principais destacam-se o tamponamento energético temporal e espacial. O tamponamento temporal refere-se ao processo de entrada de creatina na célula, passando pela ação da creatina-quinase citosólica ou no espaço intermembrana mitocondrial. Desse modo, CK fica próxima dos microambientes de consumo de ATP a partir do *pool* de PCr e dos de geração de PCr, que são os sítios glicolíticos e de fosforilação oxidativa (Schlattner et al. 2006). O tamponamento espacial é também chamado de sistema de transporte de energia, pois sugere que a PCr serviria como transportador de energia, conectando sítios de liberação e captação de energia por meio das isoformas de CK (Wallimann et al. 1992). O sistema PCr/CK impede que ocorra uma acentuada queda nos níveis de ATP durante o trabalho celular, buscando manter a razão ATP/ADP elevada nos sítios subcelulares onde CK está ligada a processos ou enzimas que consomem ATP, como por exemplo as bombas de íon (Wallimann 1994, Wallimann et al.

2011). A CK também evita a acidificação intracelular em decorrência do gasto de ATP ao utilizar H^+ na regeneração de ATP (Wallimann et al. 1992).

A perda de creatina no cérebro durante o desenvolvimento e na primeira infância, como resultado de mutações nos genes responsáveis pela síntese ou transporte de creatina, leva a retardo mental severo (Stockler et al. 2007). Além disso, em doenças neurodegenerativas, tais como doença de Huntington, na qual a disfunção energética é comumente observada, a creatina mostra efeito neuroprotetor. Também foi observada uma redução da CK cerebral na doença de Huntington, embora não se saiba se este achado é uma das causas de morte celular ou resultado do processo neurodegenerativo da doença (Zhang et al. 2011). Outros trabalhos mostram que a CK está envolvida em alterações do metabolismo energético cerebral provocadas por aminoácidos acumulados em erros inatos do metabolismo (Kessler et al. 2003, Rech et al. 2008, Tonin et al. 2009).

1.4.2. Piruvato-cinase

A reação de transferência de um grupamento fosforil do fosfoenolpiruvato (PEP) para o ADP formando piruvato e ATP é a última etapa da via glicolítica anaeróbica e é catalisada pela enzima piruvato-cinase, segundo a reação: $PEP + ADP \rightarrow \text{piruvato} + ATP$. A reação é essencialmente irreversível sob condições fisiológicas e é crítica para o controle do fluxo metabólico na segunda etapa da glicólise (Valentini et al. 2000). A glicólise é uma via fundamental para a manutenção da homeostasia e funcionamento celular, estando presente em todos os tipos de célula. Esse processo é essencial especialmente no cérebro, uma vez que a glicose é seu principal substrato energético (Sokoloff 1993, Erecinska et al. 1994).

São conhecidas quatro isoenzimas (L, R, M₁ e M₂) da PK, expressas em diferentes tecidos de mamíferos. Cada uma delas possui propriedades regulatórias e cinéticas distintas, refletindo as necessidades energéticas dos tecidos em que são expressas (Jurica et al. 1998).

É sabido que Phe inibe a PK por competição com os substratos da enzima, ADP e PEP (Feksa et al. 2003), e que esta enzima também está implicada em alterações energéticas observadas em outros erros inatos que provocam a acumulação de aminoácidos (Feksa et al. 2005, de Andrade et al. 2012, Gemelli et al. 2013).

1.4.3. Adenilato-cinase

A adenilato-cinase (AK) pode ser compreendida como um sensor do estado de energia celular, traduzindo pequenas alterações no equilíbrio ATP/ADP em efeitos relativamente grandes através da concentração de AMP. Estudos recentes fornecem novas evidências do papel energético, monitoração metabólica e de sinalização desempenhado pela AK, que catalisa a transferência reversível de fosfato entre ATP e AMP, conforme a reação: $2ADP \leftrightarrow ATP + AMP$. Catalisando a troca de nucleotídeos e a sinalização de AMP, a AK regula a atividade de enzimas da glicólise e glicogenólise, integrando ambas as rotas e assim uma rápida resposta às flutuações na demanda de energia pelos tecidos. Assim, a AK tem um papel fundamental dentro do sistema de regulação metabólica, coordenando componentes da rede bioenergética celular (Dzeja et al. 2009).

Juntamente com PK e CK, a AK é responsável pela rede de fosforil transferência, ou seja, elas atuam na transferência de grupamento fosforil do ATP da mitocôndria para o citosol, garantindo o fluxo de energia para os locais de demanda energética, uma vez que o ATP parece ser pouco difundido pela célula após ser produzido, necessitando de um translocador macroaniônico (Ames 2000). Reforçando essa ação em conjunto alguns trabalhos

demonstram que, quando a atividade de uma delas (CK ou AK) é diminuída, a atividade da outra aumenta (Dzeja et al. 2002, Dzeja et al. 2003, Janssen et al. 2003).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Avaliar o efeito da administração de fenilalanina a ratas Wistar durante o período de gestação e amamentação sobre alguns parâmetros de metabolismo energético no córtex cerebral e hipocampo da prole e possível efeito protetor de cotratamento com creatina e piruvato.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da administração de fenilalanina na dose de 5,2 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal a ratas Wistar e possível efeito protetor da coadministração de 0,4 mg/g creatina e 0,2 mg/g piruvato durante os períodos de gestação e lactação sobre os seguintes parâmetros na prole:

- peso corporal dos filhotes ao nascer e aos 21 dias de vida;
- peso do córtex cerebral e hipocampo aos 21 dias de vida;
- avaliar as atividades das enzimas creatina-cinase citosólica e mitocondrial, adenilato-cinase e piruvato-cinase em homogeneizado de córtex cerebral e hipocampo da prole, aos 21 dias de vida pós-natal.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo serão apresentados na sequência sob a forma de um artigo científico, o qual se encontra em fase de avaliação na revista *Neurochemical Research*.

ARTIGO

Co-administration of creatine plus pyruvate prevents the effects of phenylalanine administration to female rats during pregnancy and lactation on enzymes activity of energy metabolism in cerebral cortex and hippocampus of the offspring

Vanessa Trindade Bortoluzzi, Itiane Diehl de Franceschi, Elenara Rieger, Clóvis Milton Duval
Wannmacher

Artigo científico submetido para publicação no periódico

Neurochemical Research

Co-administration of creatine plus pyruvate prevents the effects of phenylalanine administration to female rats during pregnancy and lactation on enzymes activity of energy metabolism in cerebral cortex and hippocampus of the offspring

Vanessa Trindade Bortoluzzi, Itiane Diehl de Franceschi, Elenara Rieger, Clóvis Milton Duval Wannmacher

Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: Clovis M D 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, Brazil. Tel.: +55 51 33085575; fax: +55 51 33085535. E-mail address: clovisdw@ufrgs.br

Running title: Energy metabolism in maternal hyperphenylalaninemia

ABSTRACT

Phenylketonuria (PKU) is the most frequent inborn error of metabolism. It is caused by deficiency in the activity of phenylalanine hydroxylase, leading to accumulation of phenylalanine and its metabolites. Untreated maternal PKU or hyperphenylalaninemia may result in nonphenylketonuric offspring with low birth weight and neonatal sequelae, especially microcephaly and intellectual disability. The mechanisms underlying the neuropathology of brain injury in maternal PKU syndrome are poorly understood. In the present study, we evaluated the possible preventive effect of the co-administration of creatine plus pyruvate on the effects elicited by phenylalanine administration to female Wistar rats during pregnancy and lactation on some enzymes involved in the phosphoryltransfer network in the brain cortex and hippocampus of the offspring at 21 days of age. Phenylalanine administration provoked diminution of body, brain cortex and hippocampus weight and decrease of adenylate kinase, mitochondrial and cytosolic creatine kinase activities. Co-administration of creatine plus pyruvate was effective in the prevention of those alterations provoked by phenylalanine, suggesting that altered energy metabolism may be important in the pathophysiology of maternal PKU. If these alterations also occur in maternal PKU, it is possible that pyruvate and creatine supplementation to the phenylalanine-restricted diet might be beneficial to phenylketonuric mothers.

INTRODUCTION

Phenylketonuria (PKU) is an inborn error of metabolism characterized biochemically by the accumulation of phenylalanine (Phe) and its metabolites in blood and other tissues. It is one of a class of hyperphenylalaninemias, classified according to the blood Phe levels as following: classic PKU (Phe >1,200 $\mu\text{mol/l}$), mild PKU (Phe = 600 – 1,200 $\mu\text{mol/l}$) and mild hyperphenylalaninemia (HPA), in which blood Phe is elevated above upper reference limit, but < 600 $\mu\text{mol/l}$ [1].

Classic PKU occurs due to mutations in the gene that express phenylalanine hydroxylase (PAH), located in the chromosome 12 [2], leading to a deficiency in this enzyme activity, which catalyzes the conversion of phenylalanine (Phe) to tyrosine (Tyr). This reaction is the initial and rate-limiting step in the degradation of excess Phe from dietary proteins [3]. Once phenylalanine accumulates it follows alternatives metabolic pathways producing phenylpyruvate, phenyllactate and phenylacetate. Increased concentrations of phenylalanine and its metabolites in the blood and other tissues, including central nervous system, provokes impairments of brain function by mechanisms not yet completely understood [4] and untreated patients present microcephaly, mental retardation and seizures [5] among other neurological features.

Phe is an essential amino acid, meaning that it cannot be made in the human body and must be obtained from food sources. The essential nature of Phe has allowed for the development of nutritional treatment for PKU that remains the standard of practice today. Dietary Phe from intact protein sources can be restricted to the amount that allows for normal growth and development while preventing excessive build-up of Phe in the blood [6].

The nutritional treatment for PKU has been refined and is the mainstay of treatment for PKU [7]. When initiated within the first weeks of life and maintained throughout life, an appropriately designed nutritional treatment regimen can enable individuals with PKU to achieve and maintain normal intellectual development. This allows that women diagnosed with phenylketonuria reach the reproductive age as normal intellectual and social persons. However, because only minor, unwanted effects of elevated phenylalanine concentrations persist after adolescence [8], many people do not continue their diet. The guidelines [9] recommend that any woman planning pregnancy resume treatment before conception to achieve Phe levels of 120–360 $\mu\text{mol/l}$ and maintain these levels throughout pregnancy to reduce the risk of effects of elevated blood Phe levels on the fetus [10].

Untreated maternal phenylketonuria or hyperphenylalaninemia during pregnancy may lead to maternal phenylketonuria syndrome in the neonate. This syndrome consists of low birth weight, microcephaly, congenital heart disease, intellectual or developmental disability and facial dysmorphism [11]. However, adherence to the dietary treatment is difficult to achieve and previous studies have been shown that even in early diagnosed patients, phenylalanine levels can oscillate above the adequate values [12, 13], so adjuvant treatments may be helpful, such as the introduction of large neutral amino acids and tetrahydrobiopterin to the diet [14].

Pyruvate, an endogenous metabolite of glycolysis, can work as an anti-toxicity agent and has been shown to have a protective role in central nervous system neurons, protecting them against excitotoxic and metabolic insults [15]. The protective effects by providing simultaneous resistance to oxidative stress and mitochondrial insult are the result of a unique dual property of pyruvate with concurrent ability to serve as an effective neuronal energy substrate for glycolysis and to act as an exceptionally powerful antioxidant [16].

Creatine is an energetic substance that has been used to increase performance during exercise [17, 18]. Studies have shown that creatine has antioxidant properties in vivo and in vitro [19, 20]. Creatine is considered a neuroprotective agent in animal models of neurodegenerative diseases, such as in Huntington's and Parkinson's disease [21-23].

A recent study from our group has shown that a co-treatment with pyruvate and creatine can prevent the dendritic spines reduction caused by Phe [24]. The pyruvate and creatine combination could also prevent oxidative stress due to intrahippocampal Phe administration [25].

Several researches have shown that alteration in brain energy metabolism is associated with neurodegenerative disorders [26-29]. Decreased activity of pyruvate kinase (PK), creatine kinase (CK) and adenylate kinase (AK) has been found in the brain of animal models of some inborn errors of metabolism, such as hyperphenylalaninemia [30], hypertryptophanemia [31, 32], hyperprolinemia [33], hyperleucinemia [34], cystinosis [35] and tyrosinemia type II [36]. Our group has also demonstrated that the offspring of female rats loaded with L-histidine presented reduced cerebral cortex and hippocampus weight and decreased activity of AK, CK and PK [37].

Taking together these evidences on brain energy metabolism, and considering the observations about creatine and pyruvate effects, it is a conceivable idea that the combination of pyruvate and creatine could prevent, or even reverse existing damage in diseases that affect

brain energy metabolism, such as several inborn errors of metabolism. Therefore, the present study aims to evaluate a possible preventive effect of the co-administration of creatine and pyruvate on the effects elicited by phenylalanine administration to female rats during pregnancy and lactation on enzymes of phosphoryltransfer network in the cerebral cortex and hippocampus of the offspring.

MATERIAL and METHODS

Animals and Reagents

Twenty-four adult female and 12 adult male Wistar rats were used to mate in the experiments. Both female and male rats were bred in the Department of Biochemistry, ICBS, Federal University Federal of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS-Brazil, and were mated until pregnancy. They were kept on a 12–12 h light/dark cycle in a room acclimatized at constant temperature (22 ± 1 °C), with water and commercial chow (Supra, Porto Alegre, RS, Brazil) *ad libitum*. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, and followed the “Principles of laboratory animal care” (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH publication no. 80–23, revised 1996; <http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/>). All efforts were made in order to minimize animal suffering, using only the number of animals necessary to produce reliable scientific data. All chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Spectrophotometric readings were performed in a spectrophotometer Spectronic Genesys 8, Spectronic Instruments, Rochester, New York, USA. Fluorescence was measured in a SpectraMax M5/M5, Molecular Devices Corporation, CA, USA.

Treatment of the Rats

Rats were randomly separated into four groups - saline, phenylalanine, creatine + pyruvate and phenylalanine + creatine + pyruvate - and kept at the rate of 2 females to one male rat. Volumes of 10 μ l per g of body weight were used for creatine plus pyruvate (0.4 mg of creatine per g of body weight [38]; 0.2 mg of pyruvate per g of body weight [39]) and 30 μ l per g of body weight for L-phenylalanine (5,2 μ mol of L-phenylalanine per g of body weight [40]). The females received twice a day at 12 h interval subcutaneous administration of L-phenylalanine or saline and intraperitoneal administration of creatine + pyruvate or saline. L-

phenylalanine, creatine, pyruvate and saline solutions were buffered to pH 7.4 immediately before the administration. Treatment of the females began at the moment of the mate and continued until weaning of the offspring, at 21 postpartum days. Each group was formed by 6 mothers and their 7 litters. 3 pups from each litter were randomly selected to compose the pool set of measurements per offspring. The pups were killed at 21 days of age.

Tissue Preparation

The rats were sacrificed by decapitation without anesthesia and the brain was immediately removed and dissected on Petri dish placed on ice. The cerebellum, olfactory bulbs and pons/medulla were discarded and the cerebral cortex and hippocampus were separated and weighed. For the enzymes of phosphoryltransfer network assays the cerebral cortex and hippocampus were washed in SET buffer (0.32 M sucrose, 1 mM EGTA, 10 mM Tris–HCl, pH 7.4) and homogenized (1:10 w/v) in the same SET buffer with a Potter-Elvehjem glass homogenizer. The homogenate was centrifuged at 800×g for 10 minutes at 4 °C. Part of the supernatant was used for determination of AK activity; the pellet was discarded and the rest of the supernatant was centrifuged at 10,000×g for 15 minutes at 4 °C. The supernatant of this second centrifugation, containing cytosol and others cellular components as endoplasmatic reticulum, was collected for determination of PK and cytosolic CK activity. The pellet, containing mitochondria, myelin, synaptosomes and membrane fragments was washed twice with the same SET buffer, resuspended in 100 mM Trizma–15 mM MgSO₄–buffer, pH 7.5, for determination of mitochondrial CK activity. The supernatants were stored for no more than 1 week at -70 °C when the assay was not carried out immediately.

Measurements of Parameters of Phosphoryl Transfer Network

Creatine kinase (CK)

CK activity was assayed in the reaction mixture contained the following final concentrations: 65 mM Tris–HCl buffer, pH 7.5, 7 mM phosphocreatine, 9 mM MgSO₄, and 1 µg of protein (cytosolic or mitochondrial-rich fraction) in a final volume of 0.1 ml. After 10 minutes of pre-incubation at 37 °C, the reaction was started by the addition of 0.3 µmol of ADP. The reaction was stopped after 10 minutes by the addition of 1 µmol of p-hydroxymercuribenzoic acid. The reagent concentrations and the incubation time were chosen to assure linearity of the enzymatic reaction. Appropriate controls were carried out to measure chemical hydrolysis of phosphocreatine. The creatine formed was estimated according to the

colorimetric method of Hughes [41]. The color was developed by the addition of 0.1 mL 2% α -naphthol and 0.1 mL 0.05 % diacetyl in a final volume of 1 mL and read after 20 min at 540 nm in a spectrophotometer. Results were expressed as μ mol of creatine formed per min per mg of protein.

Adenylate kinase (AK)

AK activity was measured with a coupled enzyme assay with hexokinase (HK) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), according to Dzeja et al [42]. The reaction mixture contained 100 mM KCl, 20 mM HEPES, 20 mM glucose, 4 mM MgCl₂, 2 mM NADP⁺, 1 mM EDTA, 4.5 U/mL of HK, 2 U/mL of G6PD, and 1 μ g of protein homogenate. The reaction was initiated by the addition of 2 mM ADP and the reduction of NADP⁺ was followed at 340 nm for 3 minutes in a spectrophotometer. ADP, NADP⁺, G6PD, and HK were dissolved in water. Reagents concentration and assay time were chosen to assure the linearity of the reaction. The results were expressed in μ mol of ATP formed per min per mg of protein.

Pyruvate kinase (PK)

PK activity was assayed essentially as described by Leong et al [43]. The incubation medium consisted of 0.1 M Tris/HCl buffer, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 0.16 mM NADH, 75 mM KCl, 5.0 mM ADP, 7 U of L-lactate dehydrogenase, 0.1% (v/v) Triton X-100, and 10 μ L of the mitochondria-free supernatant in a final volume of 0.5 ml. After 10 minutes of pre-incubation at 37 °C, the reaction was started by the addition of 1 mM phosphoenol pyruvate. All assays were performed at 25 °C. Results were expressed as μ mol of pyruvate formed per min per mg of protein.

Protein Determination

Protein content of each tissue fraction of hippocampus or cerebral cortex was determined by the method of Lowry et al. [44], using serum bovine albumin as the standard.

Statistical Analysis

Data were expressed as mean \pm SD and were analyzed by two-way ANOVA (phenylalanine and creatine + pyruvate as factors). When appropriate, comparison between means was analyzed by the Tukey test when the F value was significant. All data were analyzed by the Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS). Values were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

In this study we investigated whether administration of phenylalanine to female rats during pregnancy and lactation could alter the activity of some enzymes of the phosphoryl transfer network in cerebral cortex and hippocampus of their offspring. We also investigated whether the co-administration of creatine plus pyruvate could prevent such changes.

Two-ways ANOVA showed significant main effect of Phe administration to the mothers on the body weight of the offspring at birth [F (1,26) = 8.43; $p < 0.01$] and this reduction was not reversed until the 21 postpartum day [F (1,26) = 8.07; $p < 0.01$]. (figure 1). The significant interaction between Phe and creatine plus pyruvate indicated the creatine plus pyruvate co-administration prevented weight reduction at the birth [F (1,26) = 10.94; $p < 0.01$] and at 21 postpartum day [F (1,26) = 8.25; $p < 0.01$]. Similar results were observed in respect to the cerebral cortex and hippocampus weight of the offspring at 21 postpartum day (Figure 2). Two-ways ANOVA showed significant main effect of Phe administration to the mothers on cerebral cortex [F (1,26) = 12.41; $p < 0.01$] and hippocampus [F (1,26) = 37.63; $p < 0.01$] weight of the offspring. The significant interaction between Phe and creatine plus pyruvate indicated the creatine plus pyruvate co-administration prevented weight reduction of cerebral cortex [F (1,26) = 11.71; $p < 0.01$] and hippocampus [F (1,26) = 7.38; $p < 0.01$]. These results indicate that Phe administration to the mothers during pregnancy and lactation reproduces some characteristics of maternal PKU and these characteristics are prevented by creatine plus pyruvate co-administration.

Phenylalanine administration decreased cytosolic CK activities in the brain cortex and in the hippocampus (Figure 3). Two-way ANOVA showed significant main effect of Phe in cytosolic CK activity in brain cortex [F (1,26) = 4.63; $p < 0.05$] and in hippocampus [F (1,26) = 5.17; $p < 0.05$]. The significant interaction between Phe and creatine plus pyruvate indicates that co-administration of creatine plus pyruvate prevented the decrease of cytosolic CK activity caused by Phe administration in cerebral cortex [F (1,26) = 8.92; $p < 0.01$] and in hippocampus [F (1,26) = 5.42; $p < 0.05$]. The results for mitochondrial CK activity were similar (Figure 4). Two-way ANOVA showed significant main effect of Phe in mitochondrial CK activity in brain cortex [F (1,26) = 9.41; $p < 0.01$] and in hippocampus [F (1,26) = 4.82; $p < 0.05$]. The interaction between Phe and creatine plus pyruvate indicates that co-administration of creatine plus pyruvate prevented the decrease of mitochondrial CK activity caused by Phe

administration in cerebral cortex [F (1,26) = 4.52; p< 0.05] and in hippocampus [F (1,26) = 32.25; p< 0.01].

Adenylate kinase activity was reduced in the cerebral cortex [F (1,26) = 4.47; p< 0.05] and in the hippocampus [F (1,26) = 4.82; p< 0.05] of the offspring of the female rats treated with phenylalanine (Fig. 5). The interaction between Phe and creatine plus pyruvate indicates that co-administration of creatine plus pyruvate prevented the decrease of AK activity caused by Phe administration in cerebral cortex [F (1,26) = 5.58; p< 0.05] and in hippocampus [F (1,26) = 4.36; p< 0.05].

Pyruvate kinase activity was not altered by Phe administration to female rats in the brain cortex [F (1,26) = 0.02; p> 0.88] or in the hippocampus [F (1,26) = 1.12; p> 0.31] of the offspring. No significant interaction between Phe and creatine plus pyruvate was observed in the brain cortex [F (1,26) = 0.43; p> 0.51] or in the hippocampus [F (1,26) = 0.01; p> 0.92] of the offspring (Figure 6).

DISCUSSION

Animal models are not completely similar to human diseases in all its complexity. However, chemical animal models have been largely used because they have the advantage of study every substance known to accumulate in human disease against adequate control. Therefore, animal models are important in the investigation of pathophysiological mechanisms of the diseases, especially in brain metabolism, helping to suggest preventive measures and new drugs for treatment [45, 46]. Phe load to female rats during pregnancy and lactation do not reproduce entirely maternal PKU, since phenylalanine hydroxylase (PAH) is active in these animals; we did not use any enzyme inhibitor because they may have other effects than inhibition of PAH, including teratogenesis. In the present investigation, Phe levels were not measured in the brain of the pups, being possible that the observed effects observed in the offspring might be caused by other factors and not only by Phe itself. However, this may also occur in the mothers with PKU or hyperphenylalaninemia and their children. Therefore, the chemical model used in the present work has its limitations.

Several studies have shown that brain energy metabolism is altered in PKU [30, 47-50], but there are no studies regarding this subject when it comes to maternal PKU. Therefore, we decided to investigate the effect of phenylalanine administration to female rats during

pregnancy and lactation on some enzymes of phosphoryltransfer network in brain cortex and hippocampus of the offspring immediately after weaning.

The activity of three important kinases in phosphoryltransfer network and maintenance of energy balance were evaluated: CK, AK e PK [51]. Coupling of spatially separated intracellular ATP-producing and ATP-consuming processes is fundamental to the bioenergetics of living organisms, maintaining a broad range of cellular activities. However, the spatial arrangements seem to be insufficient to fulfill all cellular energetic needs [52]. Therefore, spatially arranged intracellular enzymatic networks are necessitated. These networks are catalyzed by CK, AK and enzymes of the glycolysis pathway, in especial PK, to support high-energy phosphoryltransfer and signal communication between ATP-generating and ATP-consuming/ATP-sensing processes [53-55]. This dynamic metabolic signaling through near-equilibrium enzymatic networks contributes to efficient intracellular energetic communication, maintaining the balance between cellular ATP consumption and production, maintaining a strong energetic homeostasis for preserving cell phenotype and survival under stress [52, 53, 56-58]. Enzymatic capacities, isoform distribution and the dynamics of net phosphoryl flux through the integrated phosphoryltransfer systems tightly correlate with cellular functions, indicating a critical role of such networks in efficient energy transfer and distribution, thereby maintaining the cellular energy homeostasis [53].

A diminished activity of a single enzyme of the phosphoryltransfer network is rather well tolerated. However, a decrease in the activity of two or more enzymes of this network could lead to a cumulative impairment in the communication between ATP-generating and ATP-consuming sites [52], compromising the brain development [37, 48]. Phe administration to the mothers reduced body weight of the offspring at birth and this reduction was not reversed until the 21 postpartum day. Brain cortex and hippocampus weight were also reduced in the offspring of the mothers receiving Phe during pregnancy and lactation. On the other hand, co-administration of creatine plus pyruvate prevented all these effects. These results suggest that Phe administration to the mothers during pregnancy and lactation induces energy homeostasis alteration responsible, at least in part, by the weight deficits.

We observed that cytosolic and mitochondrial CK activities were inhibited by phenylalanine administration in the two tissues studied, and so was AK, in both brain cortex and hippocampus. These data are in agreement with previous studies that have shown decreased CK activity in response to a treatment with phenylalanine [30] or in other models of

inborn errors of metabolism [37]. The co-treatment with creatine plus pyruvate was able to prevent the decrease in the activities promoted by Phe in AK and CK, in both cytosolic and mitochondrial forms, in brain cortex and hippocampus of the offspring. Regarding this, it is well known that some thiol-containing enzymes, like AK, CK and PK, may have their activities altered by thiol/disulfides exchange between the protein sulfhydryl groups and disulfides, being very sensitive to oxidative stress [59]. In this context, we have demonstrated that metabolites accumulating in some metabolic diseases of amino acid metabolism cause oxidative stress and inhibit CK, PK and AK activities [35, 60, 61] and also that the combination of creatine plus pyruvate could prevent some parameters oxidative stress [25, 62]. Therefore, considering that hyperphenylalaninemia causes oxidative stress [63], it is feasible that the co-treatment with creatine plus pyruvate plays its preventive role presented in this study through protection against oxidative stress, besides their energetic properties [16, 64].

Surprisingly, PK activity was not altered by the administration of phenylalanine in none of structures examined. Phe is known as an inhibitor of PK activity, so was expected that PK activity would be reduced in the offspring of hyperphenylalaninemic female rats, as it is in other models using Phe [65-67]. It is possible that the fetus chronic exposition to high Phe levels may result in some kind of enzymatic adaptation on PK activity. Considering that the decrease of one or more activities in the phosphoryltransfer network promotes the increase of the activity of one or more enzymes in an attempt to preserve energetic homeostasis [42, 53, 68], it is thinkable that the non altered PK activity might be a response to the decrement in the activities of cytosolic and mitochondrial CK and AK. However, the continuous presence of Phe in the fetus brain could impede the increase of the enzyme activity above the normal levels. Anyway, more research is required to enlighten this question.

In summary, in this study we demonstrated for the first time that maternal load of phenylalanine alters some important parameters of phosphoryl transfer network in the brain cortex and hippocampus of the offspring. Moreover, the co-administration of creatine and pyruvate was able to prevent the harmful effects of phenylalanine on cytosolic and mitochondrial CK and AK. Besides, body weight as brain cortex and hippocampus weight were reduced in the offspring and co-administration of creatine plus pyruvate was able to prevent these effects elicited by Phe administration, suggesting that energy homeostasis deficit could be responsible for the reduction of the weights. If these observations also occur in children born from PKU mothers, it seems reasonable to perform more studies to evaluate

the possible benefit of creatine plus pyruvate supplementation to the diet used by PKU mothers.

Acknowledgments

This work was supported by the research grants from Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and FINEP Rede Instituto Brasileiro de Neurociência.

REFERENCES

1. Scriver CR KS (2001) Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver CR BA, Sly WS, Valle D (ed) *The metabolic & molecular bases of inherited diseases*, 8 edn. McGraw-Hill, New York, pp 1667–1724
2. Kohli S, Saxena R, Thomas E, Rao P, Verma IC (2005) Prenatal diagnosis of phenylketonuria. *The Indian journal of medical research* 122:400-403
3. Flydal MI, Martinez A (2013) Phenylalanine hydroxylase: function, structure, and regulation. *IUBMB life* 65:341-349
4. Perez-Duenas B, Pujol J, Soriano-Mas C, Ortiz H, Artuch R, Vilaseca MA, Campistol J (2006) Global and regional volume changes in the brains of patients with phenylketonuria. *Neurology* 66:1074-1078
5. Surtees R, Blau N (2000) The neurochemistry of phenylketonuria. *European journal of pediatrics* 159 Suppl 2:S109-113
6. Camp KM, Lloyd-Puryear MA, Huntington KL (2012) Nutritional treatment for inborn errors of metabolism: indications, regulations, and availability of medical foods and dietary supplements using phenylketonuria as an example. *Molecular genetics and metabolism* 107:3-9
7. Lindegren ML, Krishnaswami S, Foncesbeck C, Reimschisel T, Fisher J, Jackson K, Shields T, Sathe NA, McPheeters ML (2012) In: *Adjuvant Treatment for Phenylketonuria (PKU)*. Rockville (MD),
8. Koch R, Burton B, Hoganson G, Peterson R, Rhead W, Rouse B, Scott R, Wolff J, Stern AM, Guttler F, Nelson M, de la Cruz F, Coldwell J, Erbe R, Geraghty MT, Shear C, Thomas J, Azen C (2002) Phenylketonuria in adulthood: a collaborative study. *Journal of inherited metabolic disease* 25:333-346
9. (2000) National Institutes of Health (NIH) to host a consensus development conference on screening and management for phenylketonuria (PKU). *Pediatric nursing* 26:539
10. Berry SA, Brown C, Grant M, Greene CL, Jurecki E, Koch J, Moseley K, Suter R, van Calcar SC, Wiles J, Cederbaum S (2013) Newborn screening 50 years later: access issues faced by adults with PKU. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 15:591-599
11. Didycz B, Domagala L, Pietrzyk JJ (2009) [The maternal phenylketonuria syndrom--still current problem]. *Przegląd lekarski* 66:4-10
12. Diamond A, Prevor MB, Callender G, Druin DP (1997) Prefrontal cortex cognitive deficits in children treated early and continuously for PKU. *Monographs of the Society for Research in Child Development* 62:i-v, 1-208
13. Schulpis KH, Papassotiropoulos I, Vounatsou M, Karikas GA, Tsakiris S, Chrousos GP (2004) Morning preprandial plasma ghrelin and catecholamine concentrations in patients with phenylketonuria and normal controls: evidence for catecholamine-mediated ghrelin regulation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89:3983-3987
14. McPheeters ML, Lindegren ML, Sathe N, Reimschisel T (2012) In: *Adjuvant Treatment for Phenylketonuria: Future Research Needs: Identification of Future Research Needs From Comparative Effectiveness Review No 56*. Rockville (MD),
15. Desagher S, Glowinski J, Premont J (1997) Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:9060-9067
16. Mazzi E, Soliman KF (2003) Pyruvic acid cytoprotection against 1-methyl-4-phenylpyridinium, 6-hydroxydopamine and hydrogen peroxide toxicities in vitro. *Neuroscience letters* 337:77-80
17. Sestili P, Martinelli C, Bravi G, Piccoli G, Curci R, Battistelli M, Falcieri E, Agostini D, Gioacchini AM, Stocchi V (2006) Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free radical biology & medicine* 40:837-849

18. Kraemer WJ, Volek JS (1999) Creatine supplementation. Its role in human performance. *Clinics in sports medicine* 18:651-666, ix
19. Lawler JM, Barnes WS, Wu G, Song W, Demaree S (2002) Direct antioxidant properties of creatine. *Biochemical and biophysical research communications* 290:47-52
20. Sartini S, Sestili P, Colombo E, Martinelli C, Bartolini F, Ciuffoli S, Lattanzi D, Sisti D, Cuppini R (2012) Creatine affects in vitro electrophysiological maturation of neuroblasts and protects them from oxidative stress. *Journal of neuroscience research* 90:435-446
21. Ferrante RJ, Andreassen OA, Jenkins BG, Dedeoglu A, Kuemmerle S, Kubilus JK, Kaddurah-Daouk R, Hersch SM, Beal MF (2000) Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:4389-4397
22. Matthews RT, Ferrante RJ, Klivenyi P, Yang L, Klein AM, Mueller G, Kaddurah-Daouk R, Beal MF (1999) Creatine and cyclocreatine attenuate MPTP neurotoxicity. *Experimental neurology* 157:142-149
23. Beal MF (2011) Neuroprotective effects of creatine. *Amino acids* 40:1305-1313
24. Dos Reis EA, Rieger E, de Souza SS, Rasia-Filho AA, Wannmacher CM (2013) Effects of a co-treatment with pyruvate and creatine on dendritic spines in rat hippocampus and posterodorsal medial amygdala in a phenylketonuria animal model. *Metabolic brain disease* 28:509-517
25. Berti SL, Nasi GM, Garcia C, Castro FL, Nunes ML, Rojas DB, Moraes TB, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM (2012) Pyruvate and creatine prevent oxidative stress and behavioral alterations caused by phenylalanine administration into hippocampus of rats. *Metabolic brain disease* 27:79-89
26. Mochel F, Durant B, Meng X, O'Callaghan J, Yu H, Brouillet E, Wheeler VC, Humbert S, Schiffmann R, Durr A (2012) Early alterations of brain cellular energy homeostasis in Huntington disease models. *The Journal of biological chemistry* 287:1361-1370
27. Beal MF (1995) Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annals of neurology* 38:357-366
28. Beal MF (2000) Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends in neurosciences* 23:298-304
29. Nissenkorn A, Michelson M, Ben-Zeev B, Lerman-Sagie T (2001) Inborn errors of metabolism: a cause of abnormal brain development. *Neurology* 56:1265-1272
30. Costabeber E, Kessler A, Severo Dutra-Filho C, de Souza Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM (2003) Hyperphenylalaninemia reduces creatine kinase activity in the cerebral cortex of rats. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 21:111-116
31. Cornelio AR, Rodrigues V, Jr., de Souza Wyse AT, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wannmacher CM (2004) Tryptophan reduces creatine kinase activity in the brain cortex of rats. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 22:95-101
32. Feksa LR, Cornelio AR, Vargas CR, de Souza Wyse AT, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wannmacher CM (2003) Alanine prevents the inhibition of pyruvate kinase activity caused by tryptophan in cerebral cortex of rats. *Metabolic brain disease* 18:129-137
33. Kessler A, Costabeber E, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM (2003) Proline reduces creatine kinase activity in the brain cortex of rats. *Neurochemical research* 28:1175-1180
34. Pilla C, de Oliveira Cardozo RF, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM (2003) Effect of leucine administration on creatine kinase activity in rat brain. *Metabolic brain disease* 18:17-25
35. Rech VC, Feksa LR, Fleck RM, Athaydes GA, Dornelles PK, Rodrigues-Junior V, Wannmacher CM (2008) Cysteamine prevents inhibition of thiol-containing enzymes caused by cystine or cystine dimethylester loading in rat brain cortex. *Metabolic brain disease* 23:133-145

36. de Andrade RB, Gemelli T, Rojas DB, Funchal C, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM (2012) Tyrosine impairs enzymes of energy metabolism in cerebral cortex of rats. *Molecular and cellular biochemistry* 364:253-261
37. Rojas DB, de Andrade RB, Gemelli T, Oliveira LS, Campos AG, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM (2012) Effect of histidine administration to female rats during pregnancy and lactation on enzymes activity of phosphoryltransfer network in cerebral cortex and hippocampus of the offspring. *Metabolic brain disease* 27:595-603
38. Stockler S, Holzbach U, Hanefeld F, Marquardt I, Helms G, Requart M, Hanicke W, Frahm J (1994) Creatine deficiency in the brain: a new, treatable inborn error of metabolism. *Pediatric research* 36:409-413
39. Ryu JK, Choi HB, McLarnon JG (2006) Combined minocycline plus pyruvate treatment enhances effects of each agent to inhibit inflammation, oxidative damage, and neuronal loss in an excitotoxic animal model of Huntington's disease. *Neuroscience* 141:1835-1848
40. Feksa LR, Cornelio AR, Rech VC, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM (2002) Alanine prevents the reduction of pyruvate kinase activity in brain cortex of rats subjected to chemically induced hyperphenylalaninemia. *Neurochemical research* 27:947-952
41. Hughes BP (1962) A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 7:597-603
42. Dzeja PP, Vitkevicius KT, Redfield MM, Burnett JC, Terzic A (1999) Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium : increased contribution in heart failure. *Circulation research* 84:1137-1143
43. Leong SF LJ, Lim L, Clark JB. (1981) Energy-metabolizing enzymes in brain regions of adult and aging rats. *Journal of neurochemistry* 37:1548-1556
44. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193:265-275
45. Moraes TB, Zanin F, da Rosa A, de Oliveira A, Coelho J, Petrillo F, Wajner M, Dutra-Filho CS (2010) Lipoic acid prevents oxidative stress in vitro and in vivo by an acute hyperphenylalaninemia chemically-induced in rat brain. *Journal of the neurological sciences* 292:89-95
46. Skvorak KJ (2009) Animal models of maple syrup urine disease. *Journal of inherited metabolic disease* 32:229-246
47. Lutz Mda G, Feksa LR, Wyse AT, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wannmacher CM (2003) Alanine prevents the in vitro inhibition of glycolysis caused by phenylalanine in brain cortex of rats. *Metabolic brain disease* 18:87-94
48. Pietz J, Rupp A, Ebinger F, Rating D, Mayatepek E, Boesch C, Kreis R (2003) Cerebral energy metabolism in phenylketonuria: findings by quantitative In vivo 31P MR spectroscopy. *Pediatric research* 53:654-662
49. Granett SE, Wells WW (1972) Energy metabolism in the brains of L-phenylalanine-treated chicks. *Journal of neurochemistry* 19:1089-1098
50. Glazer RI, Weber G (1971) The effects of L-phenylalanine and phenylpyruvate on glycolysis in rat cerebral cortex. *Brain research* 33:439-450
51. Saks V, Dzeja P, Schlattner U, Vendelin M, Terzic A, Wallimann T (2006) Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-Starling law. *The Journal of physiology* 571:253-273
52. Dzeja PP, Redfield MM, Burnett JC, Terzic A (2000) Failing energetics in failing hearts. *Current cardiology reports* 2:212-217
53. Dzeja PP, Terzic A (2003) Phosphotransfer networks and cellular energetics. *The Journal of experimental biology* 206:2039-2047
54. Dzeja PP, Zeleznikar RJ, Goldberg ND (1998) Adenylate kinase: kinetic behavior in intact cells indicates it is integral to multiple cellular processes. *Molecular and cellular biochemistry* 184:169-182
55. Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM (1992) Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high

- and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *The Biochemical journal* 281 (Pt 1):21-40
56. Saks VA, Khuchua ZA, Vasilyeva EV, Belikova O, Kuznetsov AV (1994) Metabolic compartmentation and substrate channelling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases in in vivo regulation of cellular respiration--a synthesis. *Molecular and cellular biochemistry* 133-134:155-192
 57. Dzeja P, Terzic A (2009) Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. *International journal of molecular sciences* 10:1729-1772
 58. Chung S, Arrell DK, Faustino RS, Terzic A, Dzeja PP (2010) Glycolytic network restructuring integral to the energetics of embryonic stem cell cardiac differentiation. *Journal of molecular and cellular cardiology* 48:725-734
 59. Gilbert HF (1984) Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange. *Methods in enzymology* 107:330-351
 60. Tonin AM, Ferreira GC, Schuck PF, Viegas CM, Zanatta A, Leipnitz G, Seminotti B, Duvall Wannmacher CM, Wajner M (2009) Inhibition of creatine kinase activity by lysine in rat cerebral cortex. *Metabolic brain disease* 24:349-360
 61. Figueiredo VC, Feksa LR, Wannmacher CM (2009) Cysteamine prevents inhibition of adenylate kinase caused by cystine in rat brain cortex. *Metabolic brain disease* 24:373-381
 62. Andrade VS, Rojas DB, Oliveira L, Nunes ML, de Castro FL, Garcia C, Gemelli T, de Andrade RB, Wannmacher CM (2012) Creatine and pyruvate prevent behavioral and oxidative stress alterations caused by hypertryptophanemia in rats. *Molecular and cellular biochemistry* 362:225-232
 63. Kienzle Hagen ME, Pederzoli CD, Sgaravatti AM, Bridi R, Wajner M, Wannmacher CM, Wyse AT, Dutra-Filho CS (2002) Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. *Biochimica et biophysica acta* 1586:344-352
 64. Rae C, Digney AL, McEwan SR, Bates TC (2003) Oral creatine monohydrate supplementation improves brain performance: a double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society* 270:2147-2150
 65. Feksa LR, Cornelio AR, Dutra-Filho CS, de Souza Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM (2003) Characterization of the inhibition of pyruvate kinase caused by phenylalanine and phenylpyruvate in rat brain cortex. *Brain research* 968:199-205
 66. Miller AL, Hawkins RA, Veech RL (1973) Phenylketonuria: phenylalanine inhibits brain pyruvate kinase in vivo. *Science* 179:904-906
 67. Williams R, Holyoak T, McDonald G, Gui C, Fenton AW (2006) Differentiating a ligand's chemical requirements for allosteric interactions from those for protein binding. Phenylalanine inhibition of pyruvate kinase. *Biochemistry* 45:5421-5429
 68. Pucar D, Dzeja PP, Bast P, Gumina RJ, Drahl C, Lim L, Juranic N, Macura S, Terzic A (2004) Mapping hypoxia-induced bioenergetic rearrangements and metabolic signaling by 18O-assisted 31P NMR and 1H NMR spectroscopy. *Molecular and cellular biochemistry* 256-257:281-289

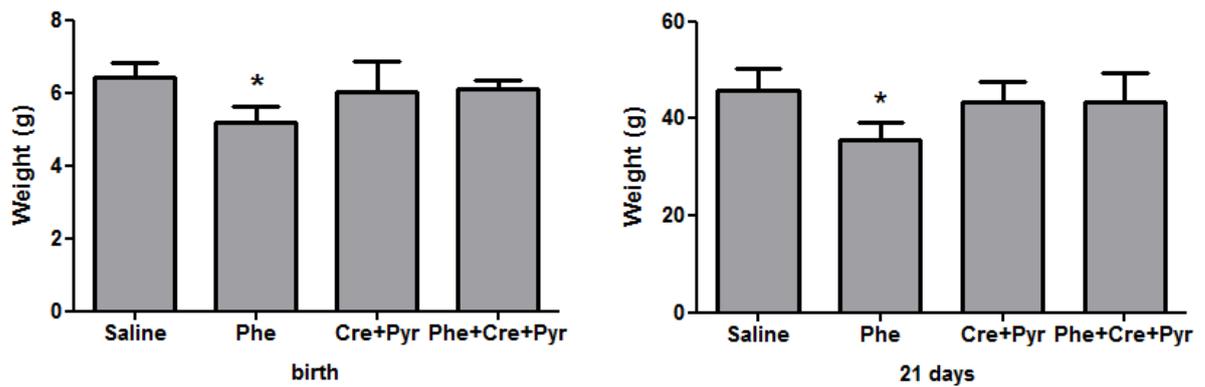


Figure 1 Effect of co-administration of creatine plus pyruvate on the diminution of the body weight at birth and after 21 days caused by phenylalanine administration to Wistar rats during pregnancy and lactation on the cerebral cortex and hippocampus of the offspring.

Data are mean \pm SD for 6-7 animals in each group. Body weight is expressed in grams. * $p < 0,05$ compared to the other groups (two-ways ANOVA followed by Tukey test).

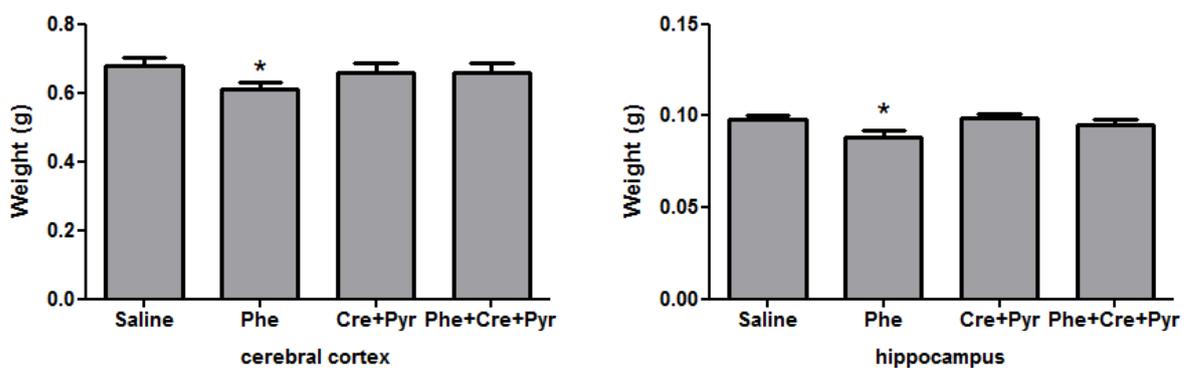


Figure 2 Effect of co-administration of creatine plus pyruvate on the diminution of the cerebral cortex and hippocampus weight caused by phenylalanine administration to Wistar rats during pregnancy and lactation on the cerebral cortex and hippocampus of the offspring.

Data are mean \pm SD for 6-7 animals in each group. Body weight is expressed in grams. * $p < 0,05$ compared to the other groups (two-ways ANOVA followed by Tukey test).

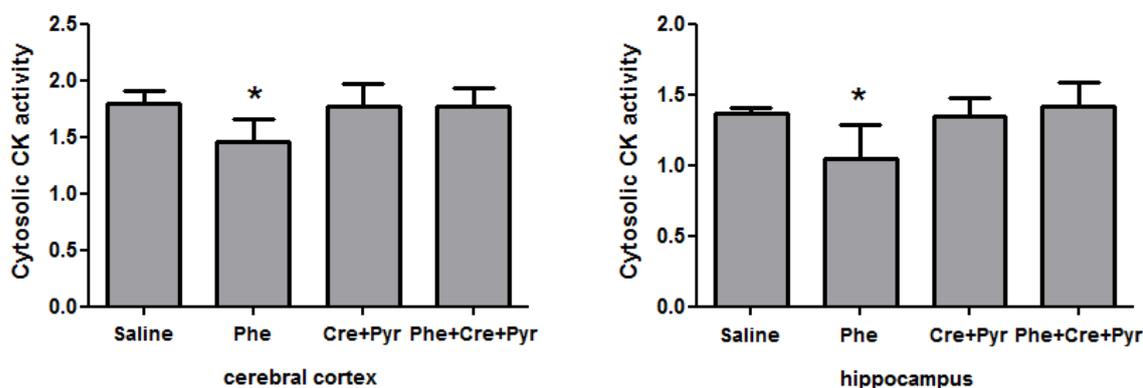


Figure 3 Effect of co-administration of creatine plus pyruvate on the inhibition of cytosolic creatine kinase (CK) activity caused by phenylalanine administration to Wistar rats during pregnancy and lactation on the cerebral cortex and hippocampus of the offspring.

Data are mean \pm SD for 6-7 animals in each group. CK activity is expressed as micromol of creatine formed per minute per mg protein. * $p < 0,05$ compared to the other groups (two-ways ANOVA followed by Tukey test).

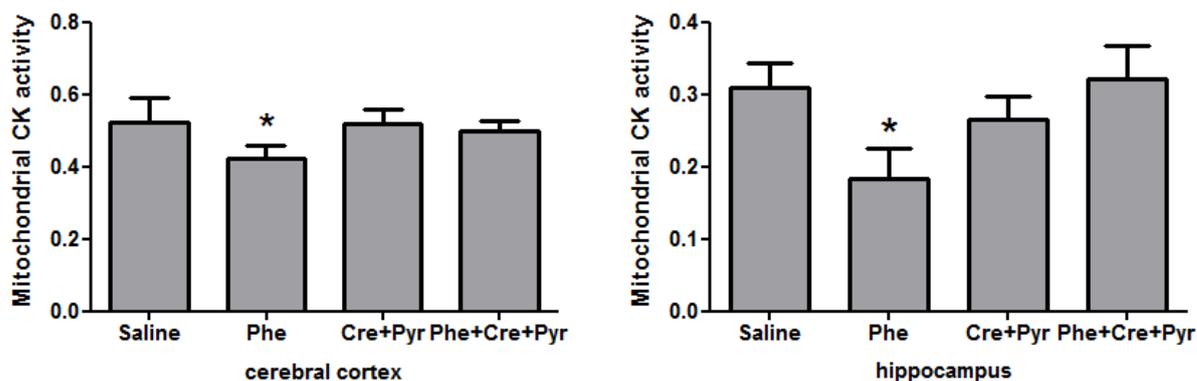


Figure 4 Effect of co-administration of creatine plus pyruvate on the inhibition of mitochondrial creatine kinase (CK) activity caused by phenylalanine administration to Wistar rats during pregnancy and lactation on the cerebral cortex and hippocampus of the offspring.

Data are mean \pm SD for 6-7 animals in each group. CK activity is expressed as micromol of creatine formed per minute per mg of protein. * $p < 0,05$ compared to the other groups (two-ways ANOVA followed by Tukey test).

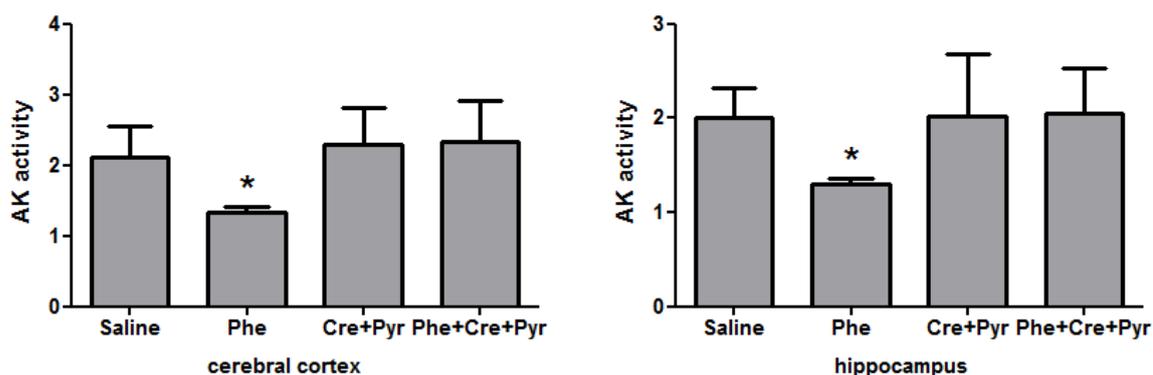


Figure 5 Effect of co-administration of creatine plus pyruvate on the inhibition of adenylate kinase (AK) activity caused by phenylalanine administration to Wistar rats during pregnancy and lactation on the cerebral cortex and hippocampus of the offspring.

Data are mean \pm SD for 6-7 animals in each group. AK activity is expressed as micromol of ATP formed per minute per mg of protein. * $p < 0,05$ compared to the other groups (two-ways ANOVA followed by Tukey test).

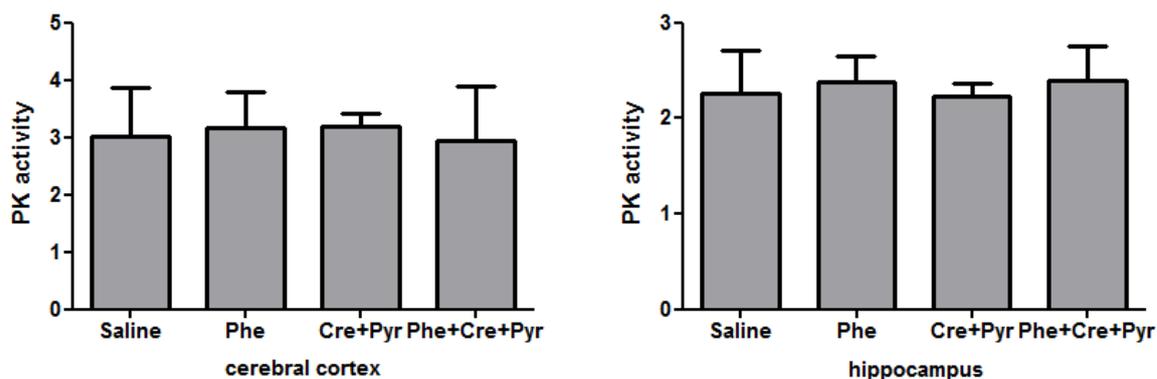


Figure 6 Effect of phenylalanine administration and co-administration of creatine plus pyruvate on pyruvate kinase (PK) activity to Wistar rats during pregnancy and lactation on the cerebral cortex and hippocampus of the offspring.

Data are mean \pm SD for 6-7 animals in each group. PK activity is expressed as micromol of pyruvate formed per minute per mg of protein.

4. DISCUSSÃO

A fenilcetonúria é uma das desordens mais prevalentes causada por um erro inato do metabolismo de aminoácidos. Essa desordem resulta de mutações no gene da enzima fenilalanina-hidroxilase, que converte fenilalanina em tirosina. Os fenótipos podem variar de um leve aumento nas concentrações sanguíneas de fenilalanina até a forma clássica da doença, com pronunciada hiperfenilalaninemia, que, caso não tratada, resulta em severo retardo mental (Blau et al. 2010). Investigações neuropatológicas em pacientes fenilcetonúricos mostraram baixo peso cerebral, redução na formação de mielina com lesões na substância branca, menor desenvolvimento das ramificações dendríticas e menos síntese de dopamina, norepinefrina e serotonina (Huttenlocher 2000).

O desenvolvimento dos testes de triagem para PKU (Guthrie et al. 1963) e o tratamento dietético tornaram possível a prevenção do déficit intelectual em crianças afetadas em todo o mundo. Os benefícios da dieta de ingestão restrita de proteínas são claros e incluem: diminuição das concentrações de Phe, ou seja, desvio da anormalidade bioquímica, aumento do desempenho neurológico e psicológico e prevenção do dano neurológico (Scriver CR 2001). Além disso, a PKU serve como modelo para o estudo de mais de 200 outros erros inatos do metabolismo (Applegarth et al. 2000, Raghuvver et al. 2006).

Em se tratando da fenilcetonúria materna, esta é uma síndrome que resulta em múltiplas anomalias congênitas na prole, usualmente consistindo em microcefalia, retardo do crescimento intrauterino, dismorfias e doença cardíaca congênita (Koch et al. 2000). A dificuldade de controlar os níveis de Phe após a primeira infância, quando os efeitos da descontinuação da dieta já não são tão pronunciados, é amplamente reconhecida e constitui risco que pode levar à ocorrência da síndrome da PKU materna, especialmente nos casos de gravidez não planejada (Walter et al. 2002, Prick et al. 2012).

Neste contexto, considerando o papel fundamental da energia no desenvolvimento do cérebro (Herculano-Houzel 2011), muitos estudos têm mostrado que o metabolismo energético está alterado na PKU (Glazer et al. 1971, Granett et al. 1972, Costabeber et al. 2003, Lutz Mda et al. 2003, Pietz et al. 2003), mas não há estudos sobre o assunto quando se trata da síndrome da fenilcetonúria materna. Assim, o presente trabalho investigou o efeito da sobrecarga de L-fenilalanina administrada a ratas Wistar, durante o período de gestação e lactação, sobre parâmetros de desenvolvimento e metabolismo energético da prole e uma possível prevenção desses efeitos através da administração de creatina e piruvato. Deve-se salientar que, em virtude da atividade enzimática normal de PAH nos animais utilizados, nosso modelo reproduz os efeitos da sobrecarga de Phe, não os da deficiência enzimática presente na fenilcetonúria.

Inicialmente, observamos que a administração de Phe às mães provocou redução do peso corporal da prole no nascimento, e essa redução não foi revertida até o dia 21 pós-parto. O peso do córtex cerebral e hipocampo também foram reduzidos na prole de mães que receberam Phe durante a gravidez e lactação. Por outro lado, a co-administração de creatina e piruvato preveniu todos estes efeitos. Estes resultados sugerem que a administração de Phe às mães durante a gravidez e lactação induz alteração na homeostase energética, sendo esta alteração responsável, pelo menos em parte, pelos déficits de peso.

As células do sistema nervoso central requerem grandes quantidades de energia para a manutenção de processos como neurotransmissão e do potencial de membrana conferido pela atividade da Na^+/K^+ ATPase, por exemplo (Ames 2000). O acoplamento de sítios intracelulares produtores e consumidores de ATP, os quais se encontram separados espacialmente, é fundamental para a manutenção desses e de outros processos que dependem de ATP para seu funcionamento. O sistema PCr/CK e AK atuam como mecanismos que reduzem a limitação do distanciamento espacial (Dzeja et al. 1998, Dzeja et al. 2002). As

enzimas da via glicolítica também participam da fosforil transferência através do grupamento fosforil provindo do ATP que entra na glicólise e, desse modo, pode fosforilar ADP através da piruvato-cinase (Janssen et al. 2003). Esse conjunto dinâmico de sinalização metabólica envolvendo a rede enzimática contribui para o balanço celular dos níveis de ATP entre os locais de produção e consumo, garantindo a homeostasia energética em condições de estresse metabólico (Dzeja et al. 2003).

A creatina-cinase é o principal componente da rede de transferência de fosforilação dos locais de produção para os de consumo de ATP (Wallimann et al. 1992). O comprometimento da atividade dessa enzima tem sido relacionado ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como Alzheimer (Hensley et al. 1995, Aksenov et al. 1997) e doença de Huntington (Mochel et al. 2012). A diminuição da atividade de CK pode diminuir os níveis de creatina e isso não apenas reduz a eficiência da rede, mas também diminui a capacidade antioxidante, uma vez que a creatina tem capacidade antioxidante direta (Lawler et al. 2002). Pacientes com alguma síndrome de deficiência de creatina apresentam retardo do desenvolvimento mental, atraso na linguagem e epilepsia (Hahn et al. 2002, Schulze 2003). Juntamente com CK, a AK é responsável pela rede de fosforil transferência, ou seja, elas também atuam na transferência de grupamento fosforil do ATP da mitocôndria para o citosol, garantindo o fluxo de energia para os locais de demanda energética (Ames 2000).

Tem sido demonstrado que o piruvato tem propriedades antioxidantes, provavelmente atuando como um *scavenger* de H_2O_2 , protegendo as células da morte (DeBoer et al. 1993). A piruvato-cinase, por sua vez, é uma enzima chave na regulação da glicólise através da formação de piruvato, que é substrato da síntese de acetil-coenzima A, protagonista no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). O piruvato é um substrato energético oxidado, sendo importante na manutenção das funções celulares em condições de estresse oxidativo (Mallet et al. 2005, Nicholls et al. 2007). A administração de piruvato, o qual pode servir como

substrato para a produção de ATP, pode prevenir o declínio energético e apoptose neuronal (Mukherjee et al. 1997, Vlassenko et al. 2006).

Com essas considerações, a seguir investigamos a atividade dessas três cinases importantes na rede de fosforil tranferência e na manutenção do equilíbrio energético. Nós observamos que as atividades de CK citosólica e mitocondrial foram inibidas, tanto no córtex cerebral quanto no hipocampo, pela administração de fenilalanina, e o mesmo ocorreu com a atividade de AK. O co-tratamento com creatina e piruvato foi capaz de prevenir a diminuição das atividades de AK e CK, em ambas isoformas citosólica e mitocondrial, provocada pela administração de Phe, prevenção observada nos dois tecidos estudados. Sabendo do envolvimento e importância que o papel de CK e AK exerce na manutenção da homeostasia energética, sugere-se que a fenilalanina interfere no metabolismo energético cerebral também no cérebro em desenvolvimento. A esse respeito, é sabido que algumas enzimas contendo grupamento tiólico, como AK, CK e PK, podem ter as suas atividades alteradas pela troca de seus grupamentos sulfidrílicos por outros dissulfetos, sendo muito sensíveis ao estresse oxidativo (Gilbert 1984). Já demonstramos anteriormente que os metabolitos acumulados em algumas doenças do metabolismo de aminoácidos causam estresse oxidativo e inibem as atividades de CK, PK e AK (Rech et al. 2008, Figueiredo et al. 2009, Tonin et al. 2009) e também que a combinação de creatina e piruvato foi capaz de evitar alguns parâmetros de estresse oxidativo (Andrade et al. 2012, Berti et al. 2012). Portanto, considerando que a hiperfenilalaninemia provoca estresse oxidativo (Kienzle Hagen et al. 2002), é possível que o co-tratamento com creatina e piruvato desempenhe o seu papel preventivo apresentado neste estudo por meio de proteção contra o estresse oxidativo, não apenas através de suas propriedades energéticas (Mazzio et al. 2003, Rae et al. 2003).

Surpreendentemente, a atividade de PK não foi alterada nas estruturas examinadas da prole pelo tratamento com Phe às mães. A fenilalanina é conhecida como um inibidor da

atividade de PK, sendo esperada uma redução na atividade desta enzima na prole de ratas hiperfenilalaninêmicas, como ocorre em outros modelos utilizando Phe (Miller et al. 1973, Feksa et al. 2003, Williams et al. 2006). É possível que fetos submetidos à exposição crônica a altos níveis de Phe desenvolvam algum tipo de adaptação enzimática em se tratando da atividade de PK. Considerando-se que a diminuição de uma ou mais atividades da rede fosforil transferência promove o aumento da atividade de uma ou mais enzimas, na tentativa de preservar a homeostase energética (Dzeja et al. 1999, Dzeja et al. 2003, Pucar et al. 2004), é concebível que a atividade de PK possa estar alterada em resposta ao decréscimo nas atividades da CK citosólica e mitocondrial e de AK. No entanto, a presença contínua de Phe no cérebro do feto poderia impedir o aumento da atividade da enzima acima dos níveis normais. De qualquer forma, mais pesquisas são necessárias para esclarecer essa questão.

Em suma, neste estudo nós demonstramos, pela primeira vez, que uma sobrecarga de fenilalanina administrada a ratas durante o período de gestação e lactação altera alguns parâmetros importantes da rede de transferência de grupamentos fosforil no córtex cerebral e no hipocampo da prole. Também mostramos que a co-administração de creatina e piruvato foi capaz de prevenir os efeitos prejudiciais da fenilalanina nas atividades da CK citosólica e mitocondrial e de AK. Além disso, o peso do corporal, bem como o peso do córtex cerebral e hipocampo, foi reduzido na prole de ratas hiperfenilalaninêmicas e a co-administração de creatina e piruvato foi capaz de prevenir estes efeitos induzidos pela administração de Phe, sugerindo que o déficit da homeostase energética poderia ser responsável pela redução dos pesos. Se estas observações também ocorrem em crianças nascidas de mães PKU, parece razoável realizar mais estudos para avaliar o possível benefício de suplementação de creatina e piruvato na dieta usada por mães PKU.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem inferir que, em se tratando da PKU materna, as anormalidades como baixo peso ao nascimento e microcefalia observadas na prole podem estar relacionadas a perturbações do metabolismo energético provocadas pelos altos níveis de Phe. No presente estudo verificamos que a coadministração de piruvato e creatina foi capaz de proteger a prole quanto ao baixo peso ao nascer e também em relação à diminuição de peso do córtex cerebral e hipocampo, além de ter sido bem sucedida em prevenir a redução de atividade das enzimas CK citosólica e mitocondrial e AK provocadas pela sobrecarga de Phe.

Esperava-se encontrar a atividade de PK diminuída, uma vez que Phe é um conhecido inibidor da PK, no entanto, a atividade dessa enzima apresentou-se inalterada em todos os grupos. Tal achado faz suspeitar de uma possível adaptação fetal da atividade dessa enzima frente à exposição crônica à hiperfenilalaninemia durante o desenvolvimento intrauterino do cérebro, no entanto, sem estudos mais detalhados isso não pode ser afirmado.

Considerando estudos anteriores que mostraram que a administração de Phe promove estresse oxidativo e que este prejudica a atividade de CK, AK e PK, acreditamos que alterações de parâmetros do estado oxidativo celular estejam envolvidas nas características de parâmetros de metabolismo energético vistas nesse modelo de hiperfenilalaninemia materna.

6. PERSPECTIVAS

Futuramente, pretendemos avaliar o efeito protetor de creatina e piruvato em modelo de hiperfenilalaninemia materna frente a parâmetros de estresse oxidativo. Além disso, buscaremos ampliar os estudos envolvendo o metabolismo energético nesse modelo, avaliando a atividade de outras enzimas envolvidas na homeostasia energética cerebral, como lactato desidrogenase, hexocinase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aksenov, M. Y., M. V. Aksenova, R. M. Payne, C. D. Smith, W. R. Markesbery and J. M. Carney (1997). "The expression of creatine kinase isoenzymes in neocortex of patients with neurodegenerative disorders: Alzheimer's and Pick's disease." *Exp Neurol* 146(2): 458-465.

Ames, A., 3rd (2000). "CNS energy metabolism as related to function." *Brain Res Brain Res Rev* 34(1-2): 42-68.

Anastasoae, V., L. Kurzius, P. Forbes and S. Waisbren (2008). "Stability of blood phenylalanine levels and IQ in children with phenylketonuria." *Mol Genet Metab* 95(1-2): 17-20.

Andersson, H. C. (2013). "50 Years ago in The Journal of Pediatrics: Children of mothers with phenylketonuria." *J Pediatr* 163(3): 671.

Andrade, V. S., D. B. Rojas, L. Oliveira, M. L. Nunes, F. L. de Castro, C. Garcia, T. Gemelli, R. B. de Andrade and C. M. Wannmacher (2012). "Creatine and pyruvate prevent behavioral and oxidative stress alterations caused by hypertryptophanemia in rats." *Mol Cell Biochem* 362(1-2): 225-232.

Applegarth, D. A., J. R. Toone and R. B. Lowry (2000). "Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969-1996." *Pediatrics* 105(1): e10.

Austic, R. E., C. L. Su, B. J. Strupp and D. A. Levitsky (1999). "Effects of dietary mixtures of amino acids on fetal growth and maternal and fetal amino acid pools in experimental maternal phenylketonuria." *Am J Clin Nutr* 69(4): 687-696.

Beadle, G. W. and E. L. Tatum (1941). "Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 27(11): 499-506.

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

Bessman, S. P. (1998). "Historical perspective: tyrosine and maternal phenylketonuria, welcome news." *Am J Clin Nutr* 67(3): 357-358.

Bickel, H. (1954). "The effects of a phenylalanine-free and phenylalanine-poor diet in phenylpyruvic oligophrenia." *Exp Med Surg* 12(1): 114-117.

Bickel, H., J. Gerrard and E. M. Hickmans (1954). "The influence of phenylalanine intake on the chemistry and behaviour of a phenyl-ketonuric child." *Acta Paediatr* 43(1): 64-77.

Blau, N., A. Belanger-Quintana, M. Demirkol, F. Feillet, M. Giovannini, A. MacDonald, F. K. Trefz, F. van Spronsen and P. K. U. c. European (2010). "Management of

phenylketonuria in Europe: survey results from 19 countries." *Mol Genet Metab* 99(2): 109-115.

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

Blau, N., F. J. van Spronsen and H. L. Levy (2010). "Phenylketonuria." *Lancet* 376(9750): 1417-1427.

Brass, C. A., C. E. Isaacs, R. McChesney and O. Greengard (1982). "The effects of hyperphenylalaninemia on fetal development: a new animal model of maternal phenylketonuria." *Pediatr Res* 16(5): 388-394.

Brassier, A., C. Ottolenghi, N. Boddaert, P. Sonigo, T. Attie-Bitach, A. E. Millischer-Bellaiche, G. Baujat, V. Cormier-Daire, V. Valayannopoulos, N. Seta, M. Piraud, B. Chadeaux-Vekemans, C. Vianey-Saban, R. Froissart and P. de Lonlay (2012). "[Prenatal symptoms and diagnosis of inherited metabolic diseases]." *Arch Pediatr* 19(9): 959-969.

Brown, A. S., P. M. Fernhoff, S. E. Waisbren, D. M. Frazier, R. Singh, F. Rohr, J. M. Morris, A. Kenneson, P. MacDonald, M. Gwinn, M. Honein and S. A. Rasmussen (2002). "Barriers to successful dietary control among pregnant women with phenylketonuria." *Genet Med* 4(2): 84-89.

Burgard, P. (2000). "Development of intelligence in early treated phenylketonuria." *Eur J Pediatr* 159 Suppl 2: S74-79.

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

Campbell, E. and L. F. Ross (2003). "Parental attitudes regarding newborn screening of PKU and DMD." *Am J Med Genet A* 120A(2): 209-214.

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

Chien, Y. H., S. C. Chiang, A. Huang, J. M. Lin, Y. N. Chiu, S. P. Chou, T. R. Wang and W. L. Hwu (2004). "Phenylalanine hydroxylase deficiency: intelligence of patients after early dietary treatment." *Acta Paediatr Taiwan* 45(6): 320-323.

Cho, S. and J. D. McDonald (2001). "Effect of maternal blood phenylalanine level on mouse maternal phenylketonuria offspring." *Mol Genet Metab* 74(4): 420-425.

Costa, L. G., M. Guizzetti, M. Burry and J. Oberdoerster (2002). "Developmental neurotoxicity: do similar phenotypes indicate a common mode of action? A comparison of fetal alcohol syndrome, toluene embryopathy and maternal phenylketonuria." *Toxicol Lett* 127(1-3): 197-205.

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

Danks, D. M., K. Bartholome, B. E. Clayton, H. Curtius, H. Grobe, S. Kaufman, R. Leeming, W. Pfeleiderer, H. Rembold and F. Rey (1978). "Malignant hyperphenylalaninaemia-current status (June 1977)." *J Inherit Metab Dis* 1(2): 49-53.

de Andrade, R. B., T. Gemelli, D. B. Rojas, C. Funchal, C. S. Dutra-Filho and C. M. Wannmacher (2012). "Tyrosine impairs enzymes of energy metabolism in cerebral cortex of rats." *Mol Cell Biochem* 364(1-2): 253-261.

de Carvalho, T. M., H. P. dos Santos, I. C. dos Santos, P. R. Vargas and J. Pedrosa (2007). "Newborn screening: a national public health programme in Brazil." *J Inherit Metab Dis* 30(4): 615.

DeBoer, L. W., P. A. Bekx, L. Han and L. Steinke (1993). "Pyruvate enhances recovery of rat hearts after ischemia and reperfusion by preventing free radical generation." *Am J Physiol* 265(5 Pt 2): H1571-1576.

Denno, K. M. and T. W. Sadler (1990). "Phenylalanine and its metabolites induce embryopathies in mouse embryos in culture." *Teratology* 42(5): 565-570.

Dorland, L., B. T. Poll-The, M. Duran, J. A. Smeitink and R. Berger (1993). "Phenylpyruvate, fetal damage, and maternal phenylketonuria syndrome." *Lancet* 341(8856): 1351-1352.

Drogari, E., I. Smith, M. Beasley and J. K. Lloyd (1987). "Timing of strict diet in relation to fetal damage in maternal phenylketonuria. An international collaborative study by the MRC/DHSS Phenylketonuria Register." *Lancet* 2(8565): 927-930.

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

Dzeja, P. P., R. Bortolon, C. Perez-Terzic, E. L. Holmuhamedov and A. Terzic (2002). "Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(15): 10156-10161.

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

Dzeja, P. P., K. T. Vitkevicius, M. M. Redfield, J. C. Burnett and A. Terzic (1999). "Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium : increased contribution in heart failure." *Circ Res* 84(10): 1137-1143.

Dzeja, P. P., R. J. Zeleznikar and N. D. Goldberg (1998). "Adenylate kinase: kinetic behavior in intact cells indicates it is integral to multiple cellular processes." *Mol Cell Biochem* 184(1-2): 169-182.

Erecinska, M. and I. A. Silver (1994). "Ions and energy in mammalian brain." *Prog Neurobiol* 43(1): 37-71.

Erlandsen, H. and R. C. Stevens (1999). "The structural basis of phenylketonuria." *Mol Genet Metab* 68(2): 103-125.

Feksa, L. R., A. Cornelio, C. S. Dutra-Filho, A. T. Wyse, M. Wajner and C. M. Wannmacher (2005). "The effects of the interactions between amino acids on pyruvate kinase activity from the brain cortex of young rats." *Int J Dev Neurosci* 23(6): 509-514.

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

Figueiredo, V. C., L. R. Feksa and C. M. Wannmacher (2009). "Cysteamine prevents inhibition of adenylate kinase caused by cystine in rat brain cortex." *Metab Brain Dis* 24(3): 373-381.

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

Folling, A. and S. Sydnnes (1958). "A method for the estimation of phenylpyruvic acid in urine with some examples of its use in dietary treatment of phenylpyruvic oligophrenia." *Scand J Clin Lab Invest* 10(4): 355-358.

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

Gardiner, R. M. (1990). "Transport of amino acids across the blood-brain barrier: implications for treatment of maternal phenylketonuria." *J Inherit Metab Dis* 13(4): 627-633.

Gemelli, T., R. B. de Andrade, D. B. Rojas, N. F. Bonorino, P. N. Mazzola, L. S. Tortorelli, C. Funchal, C. S. Filho and C. M. Wannmacher (2013). "Effects of beta-alanine administration on selected parameters of oxidative stress and phosphoryltransfer network in cerebral cortex and cerebellum of rats." *Mol Cell Biochem* 380(1-2): 161-170.

Gilbert, H. F. (1984). "Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange." *Methods Enzymol* 107: 330-351.

Glazer, R. I. and G. Weber (1971). "The effects of L-phenylalanine and phenylpyruvate on glycolysis in rat cerebral cortex." *Brain Res* 33(2): 439-450.

Granett, S. E. and W. W. Wells (1972). "Energy metabolism in the brains of L-phenylalanine-treated chicks." *J Neurochem* 19(4): 1089-1098.

Gropman, A. L. (2012). "Patterns of brain injury in inborn errors of metabolism." *Semin Pediatr Neurol* 19(4): 203-210.

Gruetter, R. (2003). "Glycogen: the forgotten cerebral energy store." *J Neurosci Res* 74(2): 179-183.

Guthrie, R. and A. Susi (1963). "A Simple Phenylalanine Method for Detecting Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants." *Pediatrics* 32: 338-343.

Hahn, K. A., G. S. Salomons, D. Tackels-Horne, T. C. Wood, H. A. Taylor, R. J. Schroer, H. A. Lubs, C. Jakobs, R. L. Olson, K. R. Holden, R. E. Stevenson and C. E. Schwartz (2002). "X-linked mental retardation with seizures and carrier manifestations is caused by a mutation in the creatine-transporter gene (SLC6A8) located in Xq28." *Am J Hum Genet* 70(5): 1349-1356.

Hartnett, C., R. Salvarinova-Zivkovic, E. Yap-Todos, B. Cheng, A. Giezen, G. Horvath, Y. Lillquist, H. Vallance and S. Stockler-Ipsiroglu (2013). "Long-term outcomes of blood phenylalanine concentrations in children with classical phenylketonuria." *Mol Genet Metab* 108(4): 255-258.

Hensley, K., N. Hall, R. Subramaniam, P. Cole, M. Harris, M. Aksenov, M. Aksenova, S. P. Gabbita, J. F. Wu, J. M. Carney and et al. (1995). "Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation." *J Neurochem* 65(5): 2146-2156.

Herculano-Houzel, S. (2011). "Scaling of brain metabolism with a fixed energy budget per neuron: implications for neuronal activity, plasticity and evolution." *PLoS One* 6(3): e17514.

Hoang, L., S. Byck, L. Prevost and C. R. Scriver (1996). "PAH Mutation Analysis Consortium Database: a database for disease-producing and other allelic variation at the human PAH locus." *Nucleic Acids Res* 24(1): 127-131.

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

Hyanek, J., J. Cervenka, V. Trnka, A. Dolezal, V. Fuchs, J. Sracek, H. Valkova, H. Viletova, V. Kunova, M. Kubik, L. Zakova and J. Zizka (1979). "[Principles of dietary treatment in phenylalanine metabolism disturbances in pregnancy (author's transl]." *Cesk Gynekol* 44(5): 336-340.

Illsinger, S. and A. M. Das (2010). "Impact of selected inborn errors of metabolism on prenatal and neonatal development." *IUBMB Life* 62(6): 403-413.

Janssen, E., A. Terzic, B. Wieringa and P. P. Dzeja (2003). "Impaired intracellular energetic communication in muscles from creatine kinase and adenylate kinase (M-CK/AK1) double knock-out mice." *J Biol Chem* 278(33): 30441-30449.

Jervis, G. A. (1947). "Studies on phenylpyruvic oligophrenia; the position of the metabolic error." *J Biol Chem* 169(3): 651-656.

Jurica, M. S., A. Mesecar, P. J. Heath, W. Shi, T. Nowak and B. L. Stoddard (1998). "The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate." *Structure* 6(2): 195-210.

Kaufman, S. (1963). "The Structure of the Phenylalanine-Hydroxylation Cofactor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 50: 1085-1093.

Kessler, A., E. Costabeber, C. S. Dutra-Filho, A. T. Wyse, M. Wajner and C. M. Wannmacher (2003). "Proline reduces creatine kinase activity in the brain cortex of rats." *Neurochem Res* 28(8): 1175-1180.

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

Kirby, M. L. and S. T. Miyagawa (1990). "The effects of high phenylalanine concentration on chick embryonic development." *J Inherit Metab Dis* 13(4): 634-640.

Kirkman, H. N. (1982). "Projections of a rebound in frequency of mental retardation from phenylketonuria." *Appl Res Ment Retard* 3(3): 319-328.

Kobe, B., I. G. Jennings, C. M. House, B. J. Michell, K. E. Goodwill, B. D. Santarsiero, R. C. Stevens, R. G. Cotton and B. E. Kemp (1999). "Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase." *Nat Struct Biol* 6(5): 442-448.

Koch, R., W. Hanley, H. Levy, R. Matalon, B. Rouse, F. Trefz, F. Guttler, C. Azen, E. Friedman, L. Platt and F. de la Cruz (2000). "Maternal phenylketonuria: an international study." *Mol Genet Metab* 71(1-2): 233-239.

Kudo, Y. and C. A. Boyd (1990). "Transport of amino acids by the human placenta: predicted effects thereon of maternal hyperphenylalaninaemia." *J Inherit Metab Dis* 13(4): 617-626.

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

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

Lee, P. J., D. Ridout, J. H. Walter and F. Cockburn (2005). "Maternal phenylketonuria: report from the United Kingdom Registry 1978-97." *Arch Dis Child* 90(2): 143-146.

Lenke, R. R. and H. L. Levy (1980). "Maternal phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. An international survey of the outcome of untreated and treated pregnancies." *N Engl J Med* 303(21): 1202-1208.

Leonard, J. V. (1986). "Teratogenic inborn errors of metabolism." *Postgrad Med J* 62(724): 125-129.

Levy, H. L. (2003). "Historical background for the maternal PKU syndrome." *Pediatrics* 112(6 Pt 2): 1516-1518.

Levy, H. L., D. Lobbregt, P. D. Barnes and T. Y. Poussaint (1996). "Maternal phenylketonuria: magnetic resonance imaging of the brain in offspring." *J Pediatr* 128(6): 770-775.

Levy, H. L., D. Lobbregt, L. D. Platt and B. R. Benacerraf (1996). "Fetal ultrasonography in maternal PKU." *Prenat Diagn* 16(7): 599-604.

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

Levy, H. L., S. E. Waisbren, D. Lobbregt, E. Allred, A. Schuler, F. K. Trefz, S. M. Schweitzer, I. B. Sardharwalla, J. H. Walter, B. E. Barwell and et al. (1994). "Maternal mild hyperphenylalaninaemia: an international survey of offspring outcome." *Lancet* 344(8937): 1589-1594.

Lichter-Konecki, U., D. S. Konecki, A. G. DiLella, K. Brayton, J. Marvit, T. M. Hahn, F. K. Trefz and S. L. Woo (1988). "Phenylalanine hydroxylase deficiency caused by a single base substitution in an exon of the human phenylalanine hydroxylase gene." *Biochemistry* 27(8): 2881-2885.

Lidsky, A. S., M. L. Law, H. G. Morse, F. T. Kao, M. Rabin, F. H. Ruddle and S. L. Woo (1985). "Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome." *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(18): 6221-6225.

Loo, Y. H., A. Rabe, A. Potempska, P. Wang, R. Fersko and H. M. Wisniewski (1983). "Experimental maternal phenylketonuria: an examination of two animal models." *Dev Neurosci* 6(4-5): 227-234.

Lowe, M. T., E. H. Kim, R. L. Faull, D. L. Christie and H. J. Waldvogel (2013). "Dissociated expression of mitochondrial and cytosolic creatine kinases in the human brain: a new perspective on the role of creatine in brain energy metabolism." *J Cereb Blood Flow Metab* 33(8): 1295-1306.

Lutz Mda, G., L. R. Feksa, A. T. Wyse, C. S. Dutra-Filho, M. Wajner and C. M. Wannmacher (2003). "Alanine prevents the in vitro inhibition of glycolysis caused by phenylalanine in brain cortex of rats." *Metab Brain Dis* 18(1): 87-94.

Mak, C. M., H. C. Lee, A. Y. Chan and C. W. Lam (2013). "Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update." *Crit Rev Clin Lab Sci* 50(6): 142-162.

Mallet, R. T., J. Sun, E. M. Knott, A. B. Sharma and A. H. Olivencia-Yurvati (2005). "Metabolic cardioprotection by pyruvate: recent progress." *Exp Biol Med (Maywood)* 230(7): 435-443.

Matalon, K. M., P. B. Acosta and C. Azen (2003). "Role of nutrition in pregnancy with phenylketonuria and birth defects." *Pediatrics* 112(6 Pt 2): 1534-1536.

Matalon, R. and K. Michals (1991). "Phenylketonuria: screening, treatment and maternal PKU." *Clin Biochem* 24(4): 337-342.

Matalon, R., K. Michals and L. Gleason (1986). "Maternal PKU: strategies for dietary treatment and monitoring compliance." *Ann N Y Acad Sci* 477: 223-230.

Mazzio, E. and K. F. Soliman (2003). "Pyruvic acid cytoprotection against 1-methyl-4-phenylpyridinium, 6-hydroxydopamine and hydrogen peroxide toxicities in vitro." *Neurosci Lett* 337(2): 77-80.

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

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

Mochel, F., B. Durant, X. Meng, J. O'Callaghan, H. Yu, E. Brouillet, V. C. Wheeler, S. Humbert, R. Schiffmann and A. Durr (2012). "Early alterations of brain cellular energy homeostasis in Huntington disease models." *J Biol Chem* 287(2): 1361-1370.

Mukherjee, S. K., L. K. Klaidman, R. Yasharel and J. D. Adams, Jr. (1997). "Increased brain NAD prevents neuronal apoptosis in vivo." *Eur J Pharmacol* 330(1): 27-34.

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

Nicholls, D. G., L. Johnson-Cadwell, S. Vesce, M. Jekabsons and N. Yadava (2007). "Bioenergetics of mitochondria in cultured neurons and their role in glutamate excitotoxicity." *J Neurosci Res* 85(15): 3206-3212.

Pardridge, W. M. and T. B. Choi (1986). "Neutral amino acid transport at the human blood-brain barrier." *Fed Proc* 45(7): 2073-2078.

Penrose, L. and J. H. Quastel (1937). "Metabolic studies in phenylketonuria." *Biochem J* 31(2): 266-274.

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

Potocnik, U. and K. Widhalm (1994). "Long-term follow-up of children with classical phenylketonuria after diet discontinuation: a review." *J Am Coll Nutr* 13(3): 232-236.

Prick, B. W., W. C. Hop and J. J. Duvekot (2012). "Maternal phenylketonuria and hyperphenylalaninemia in pregnancy: pregnancy complications and neonatal sequelae in untreated and treated pregnancies." *Am J Clin Nutr* 95(2): 374-382.

Pucar, D., P. P. Dzeja, P. Bast, R. J. Gumina, C. Drahl, L. Lim, N. Juranic, S. Macura and A. Terzic (2004). "Mapping hypoxia-induced bioenergetic rearrangements and metabolic signaling by ¹⁸O-assisted ³¹P NMR and ¹H NMR spectroscopy." *Mol Cell Biochem* 256-257(1-2): 281-289.

Radomska, B. (2003). "[Pregnancy and inborn errors of metabolism]." *Ginekol Pol* 74(6): 479-485.

Rae, C., A. L. Digney, S. R. McEwan and T. C. Bates (2003). "Oral creatine monohydrate supplementation improves brain performance: a double-blind, placebo-controlled, cross-over trial." *Proc Biol Sci* 270(1529): 2147-2150.

Raghuveer, T. S., U. Garg and W. D. Graf (2006). "Inborn errors of metabolism in infancy and early childhood: an update." *Am Fam Physician* 73(11): 1981-1990.

Rech, V. C., L. R. Feksa, R. M. Fleck, G. A. Athaydes, P. K. Dornelles, V. Rodrigues-Junior and C. M. Wannmacher (2008). "Cysteamine prevents inhibition of thiol-containing

enzymes caused by cystine or cystine dimethylester loading in rat brain cortex." *Metab Brain Dis* 23(2): 133-145.

Rimoin, D. L. and A. E. H. Emery (2007). *Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics*. Philadelphia, Churchill Livingstone.

Rohr, F. J., D. Lobbregt and H. L. Levy (1998). "Tyrosine supplementation in the treatment of maternal phenylketonuria." *Am J Clin Nutr* 67(3): 473-476.

Rouse, B., R. Matalon, R. Koch, C. Azen, H. Levy, W. Hanley, F. Trefz and F. de la Cruz (2000). "Maternal phenylketonuria syndrome: congenital heart defects, microcephaly, and developmental outcomes." *J Pediatr* 136(1): 57-61.

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

Scarabino, T., T. Popolizio, M. Tosetti, D. Montanaro, G. M. Giannatempo, R. Terlizzi, S. Pollice, A. Maiorana, N. Maggioletti, A. Carriero, V. Leuzzi and U. Salvolini (2009). "Phenylketonuria: white-matter changes assessed by 3.0-T magnetic resonance (MR) imaging, MR spectroscopy and MR diffusion." *Radiol Med* 114(3): 461-474.

Schlattner, U., M. Tokarska-Schlattner and T. Wallimann (2006). "Mitochondrial creatine kinase in human health and disease." *Biochim Biophys Acta* 1762(2): 164-180.

Schulze, A. (2003). "Creatine deficiency syndromes." *Mol Cell Biochem* 244(1-2): 143-150.

Scriver, C. R. (2001). *The metabolic & molecular bases of inherited disease*. New York, McGraw-Hill.

Scriver, C. R. (2007). "The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift." *Hum Mutat* 28(9): 831-845.

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

Sokoloff, L. (1993). "Function-related changes in energy metabolism in the nervous system: localization and mechanisms." *Keio J Med* 42(3): 95-103.

Stockler, S., P. W. Schutz and G. S. Salomons (2007). "Cerebral creatine deficiency syndromes: clinical aspects, treatment and pathophysiology." *Subcell Biochem* 46: 149-166.

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

Teissier, R., E. Nowak, M. Assoun, K. Mention, A. Cano, A. Fouilhoux, F. Feillet, H. Ogier, E. Oger, L. de Parscau and Afdphe (2012). "Maternal phenylketonuria: low phenylalaninemia might increase the risk of intra uterine growth retardation." *J Inherit Metab Dis* 35(6): 993-999.

Thalhammer, O. (1975). "Frequency of inborn errors of metabolism, especially PKU, in some representative newborn screening centers around the world: a collaborative study." *Humangenetik* 30(4): 273-286.

Tonin, A. M., G. C. Ferreira, P. F. Schuck, C. M. Viegas, A. Zanatta, G. Leipnitz, B. Seminotti, C. M. Duvall Wannmacher and M. Wajner (2009). "Inhibition of creatine kinase activity by lysine in rat cerebral cortex." *Metab Brain Dis* 24(2): 349-360.

Udenfriend, S. and J. R. Cooper (1952). "The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine." *J Biol Chem* 194(2): 503-511.

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

Valentini, G., L. Chiarelli, R. Fortin, M. L. Speranza, A. Galizzi and A. Mattevi (2000). "The allosteric regulation of pyruvate kinase." *J Biol Chem* 275(24): 18145-18152.

van Spronsen, F. J. (2010). "Phenylketonuria: a 21st century perspective." *Nat Rev Endocrinol* 6(9): 509-514.

van Spronsen, F. J., M. J. de Groot, M. Hoeksma, D. J. Reijngoud and M. van Rijn (2010). "Large neutral amino acids in the treatment of PKU: from theory to practice." *J Inherit Metab Dis* 33(6): 671-676.

van Spronsen, F. J. and G. M. Enns (2010). "Future treatment strategies in phenylketonuria." *Mol Genet Metab* 99 Suppl 1: S90-95.

van Spronsen, F. J., M. Hoeksma and D. J. Reijngoud (2009). "Brain dysfunction in phenylketonuria: is phenylalanine toxicity the only possible cause?" *J Inher Metab Dis* 32(1): 46-51.

Vlassenko, A. G., M. M. Rundle, M. E. Raichle and M. A. Mintun (2006). "Regulation of blood flow in activated human brain by cytosolic NADH/NAD⁺ ratio." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(6): 1964-1969.

Vockley, J., H. C. Andersson, K. M. Antshel, N. E. Braverman, B. K. Burton, D. M. Frazier, J. Mitchell, W. E. Smith, B. H. Thompson and S. A. Berry (2014). "Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline." *Genet Med* 16(2): 188-200.

Wallimann, T. (1994). "Bioenergetics. Dissecting the role of creatine kinase." *Curr Biol* 4(1): 42-46.

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

Wallimann, T., M. Wyss, D. Brdiczka, K. Nicolay and H. M. Eppenberger (1992). "Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis." *Biochem J* 281 (Pt 1): 21-40.

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

Williams, R., T. Holyoak, G. McDonald, C. Gui and A. W. Fenton (2006). "Differentiating a ligand's chemical requirements for allosteric interactions from those for protein binding. Phenylalanine inhibition of pyruvate kinase." *Biochemistry* 45(17): 5421-5429.

Zhang, S. F., T. Hennessey, L. Yang, N. N. Starkova, M. F. Beal and A. A. Starkov (2011). "Impaired brain creatine kinase activity in Huntington's disease." *Neurodegener Dis* 8(4): 194-201.

Zhu, X. H., H. Qiao, F. Du, Q. Xiong, X. Liu, X. Zhang, K. Ugurbil and W. Chen (2012). "Quantitative imaging of energy expenditure in human brain." *Neuroimage* 60(4): 2107-2117.

Zurfluh, M. R., M. Giovannini, L. Fiori, B. Fiege, Y. Gokdemir, T. Baykal, L. Kierat, K. H. Gartner, B. Thony and N. Blau (2005). "Screening for tetrahydrobiopterin deficiencies using dried blood spots on filter paper." *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1: S96-103.