

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

CURSO DE FARMÁCIA

KEITI COSTA FERNANDES

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO *IN VIVO* DA FENILALANINA SOBRE A
ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE EM CÉREBRO DE RATOS
JOVENS**

Trabalho apresentado para cumprimento da disciplina de TCC II, no Curso de Farmácia da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, orientador Prof.Dr. Gustavo C. Ferreira

CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2011.

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO *IN VIVO* DA FENILALANINA SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE EM CÉREBRO DE RATOS JOVENS

Keiti Costa Fernandes¹, Patricia F. Schuck¹, Gustavo C. Ferreira¹

¹Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, Universidade Extremo Sul Catarinense,UNESC, Criciúma-SC, Brasil

Autor Correspondente: Keiti Costa Fernandes, Avenida Universitária, 1105 Criciúma - SC, 88806-000

Tel: (0xx)48 3431-2500, Email: keitimauro@hotmail.com

Abstract

Phenylketonuria is caused by a deficiency of the enzyme phenylalanine hydroxylase and biochemically characterized by the accumulation of phenylalanine (Phe) in tissues and body fluids of patients. Considering that patients pronounced brain damaged and that the pathophysiological mechanisms remain unclear, this study evaluated the activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) in the cerebral cortex, striatum and hippocampus of young mice that received Phe clorfenilalanina p-(p-Cl-Phe, phenylalanine hydroxylase inhibitor) or a combination thereof. We observed a significant increase in AChE enzyme activity in the striatum of animals receiving the combination of Phe and p-Cl-Phe, but not when drugs were given alone. The AChE enzyme activity was unchanged in the cerebral cortex and hippocampus of animals in any of the experimental groups. We suggest that high concentrations of Phe associated with inhibition of the enzyme phenylalanine hydroxylase cause changes in cholinergic synapses, which can lead to brain damage found in PKU patients.

Keywords: inborn error of metabolism. Phenylketonuria. Acetylcholinesterase.

Resumo

A fenilcetonúria é causada pela deficiência da enzima fenilalanina hidroxilase e caracterizada bioquimicamente pelo acúmulo de fenilalanina (Phe) nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes. Considerando que os pacientes apresentam dano cerebral pronunciado e que os mecanismos fisiopatológicos

ainda não estão esclarecidos, neste trabalho avaliamos a atividade da enzima acetilcolinesterase (Ache) em córtex cerebral, estriado e hipocampo de ratos Wistar jovens que receberam Phe, p-clorfenilalanina (p-Cl-Phe; inibidor da fenilalanina hidroxilase) ou a combinação destes. Obsevamos um aumento significativo na atividade da enzima Ache no estriado dos animais que receberam a combinação de Phe e p-Cl-Phe, mas não quando administradas isoladamente. A atividade da enzima Ache não foi alterada em córtex cerebral e hipocampo dos animais em nenhum dos grupos experimentais. Podemos sugerir que altas concentrações de Phe associadas à inibição da enzima fenilalanina hidroxilase causam alterações em sinapses colinérgicas, que podem levar ao dano cerebral encontrado em pacientes fenilcetonúricos.

Palavras-chave: Erro Inato do Metabolismo. Fenilcetonúria. Acetilcolinesterase.

Introdução

A PKU é um dos mais freqüentes e estudados erros inatos do metabolismo. É uma doença genética de caráter autossômico recessivo com prevalência de aproximadamente 1:10.000 na população caucasiana (Scriver et al 2001). A doença é caracterizada bioquimicamente pela ausência ou deficiência da atividade da enzima hepática fenilalanina hidroxilase (PAH), ou mais raramente, de seu cofator, a tetraidrobiopterina (BH₄). A PAH é a enzima responsável pela primeira reação na via de degradação da Phe, catalisando a sua hidroxilação em tirosina (Tyr). Portanto, uma alteração nessa enzima pode ocasionar acúmulo do substrato Phe a níveis bastante elevados, além da ocorrência de reações paralelas, como a transaminação da Phe com o piruvato produzindo o metabólito fenilpiruvato. Seguidamente, a descarboxilação deste metabólito origina fenilacetato, enquanto a sua redução leva à produção do fenilactato. O fenilacetato poderá, posteriormente, ser conjugado com a glutamina e produzir fenilacetilglutamina (Scriver & Kaufman 2001). Além disso, ocorre a diminuição da concentração do produto Tyr, responsável pela biossíntese de diversos neurotransmissores, como dopamina e norepinefrina (Lehninger 2006). Como a principal via catabólica da Phe está bloqueada na PKU, pacientes afetados por essa doença apresentam níveis sanguíneos desse aminoácido até 20 vezes maiores que pessoas saudáveis (Stryer et al 2002).

As principais manifestações clínicas da fenilcetonúria correspondem a alterações neurológicas. Os pacientes fenilcetonúricos não tratados apresentam retardo mental grave. O peso cerebral dos pacientes é inferior ao de pessoas saudáveis e eles apresentam defeitos na mielinização e reflexos hiperativos. A expectativa de vida

dos pacientes não tratados é reduzida drasticamente. Embora muitos estudos venham sendo realizados, as bases bioquímicas do retardo mental na PKU ainda permanecem obscuras (Scriver et al 2001).

O desenvolvimento cognitivo e as funções neurológicas deficientes em PKU são complexos, mas há um consenso emergente de que a própria Phe, em concentrações elevadas, é uma molécula nociva (Scriver & Kaufman, 2001). Alguns estudos sugerem que concentrações elevadas de fenilalanina e/ou seus metabólitos exerceriam uma toxicidade direta no sistema nervoso central (SNC), já que a diminuição das concentrações de fenilalanina através da instauração do tratamento dietético tem conseguido melhorar o quadro neurológico grave apresentado por pacientes fenilcetonúricos não tratados (Campistol et al 2001; Surtees & Blau 2000). Concentrações elevadas de Phe parecem influenciar diversos mecanismos cerebrais como a excitabilidade neural, a condução axonal e a velocidade na transmissão sináptica (Burri et al 1990; Fernstrom 1994). Também foi demonstrado que a atividade da Na^+, K^+ -ATPase está reduzida na membrana sináptica em modelos animais de PKU (Wyse et al 1994).

Diferentes aminoácidos neutros, como fenilalanina, valina, leucina, tirosina, isoleucina, treonina, histidina, metionina e triptofano, utilizam o mesmo sistema de transporte através da barreira hematoencefálica. Portanto, o excesso de Phe na PKU aumenta a competição pelo transportador e diminui a passagem dos demais aminoácidos neutros pela barreira, causando déficit destes aminoácidos no líquido cefalorraquidiano. Estudos têm demonstrado que esse déficit pode ocasionar diferentes alterações metabólicas e manifestações clínicas, que podem contribuir para a patogenia da PKU. Os desequilíbrios plasmáticos e intracelulares dos aminoácidos neutros provocam a redução de suas concentrações no SNC e a formação de proteínas anômalas, que se tem relacionado com uma proliferação dendrítica e uma mielinização defeituosa na PKU (Surtees & Blau 2000; Campistol et al 2001).

Modelos animais de PKU, induzidos através da administração de altas doses de Phe associadas à administração de p-clorofenilalanina, um inibidor da enzima fenilalanina hidroxilase, têm sido uma importante ferramenta no estudo dos efeitos tóxicos da Phe, visto que mimetizam a principal característica dos pacientes fenilcetonúricos, que são os altos níveis de Phe no sangue e nos tecidos dos animais (Streck et al 2000).

A atividade da enzima creatina quinase (CK) também pode ser um importante passo no processo neurodegenerativo. Observa-se em um estudo realizado com córtex cerebral de animais submetidos a um modelo experimental crônico de hiperfenilalaninemia, a atividade significativamente reduzida da CK nos animais. Os resultados dos experimentos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que altos níveis de Phe podem diminuir a atividade

da CK através da inibição enzimática e redução do número de moléculas ativas da enzima (Costabeber et al 2003).

Alguns pesquisadores têm sugerido que o estresse oxidativo está implicado na patogenia da PKU. Hagen e colaboradores (2002) mostraram que a quimiluminescência, um parâmetro de lipoperoxidação, está aumentada enquanto o potencial antioxidante total está reduzido no cérebro de ratos hiperfenilalaninêmicos e que a atividade da enzima catalase foi inibida pela Phe *in vitro* e *in vivo*. Além disso, Van Bakel e colaboradores (2000) encontraram uma diminuição dos níveis de selênio séricos, além da diminuição do status antioxidante total em pacientes com PKU clássica e também com HPA persistente benigna tratados.

Alguns estudos também demonstraram que altas concentrações de Phe alteram *in vitro* as atividades das enzimas acetilcolinesterase e Na^+, K^+ -ATPase em diferentes estruturas cerebrais de ratos (Tsakiris 2001; Doulgeraki et al 2002). Também foram observadas alterações da atividade da enzima acetilcolinesterase em eritrócitos de pacientes fenilcetonúricos (Tsakiris et al 2002). Entretanto, até o momento ainda pouco se sabe sobre os efeitos *in vivo* da Phe em animais submetidos a modelos experimentais de PKU.

A acetilcolina uma vez liberada na sinapse é degradada pela enzima acetilcolinesterase, em acetato e colina, sendo esta última recaptada pelo neurônio. A AChE é uma enzima heterogênea encontrada em sinapses colinérgicas e nas junções neuromusculares (Grisaru et al 1999). Alterações da atividade da AChE foram correlacionadas com o desenvolvimento de deficiência mental em alguns pacientes (Schulpis et al 2002).

Na tentativa de confirmar se os efeitos encontrados *in vitro* ocorrem também *in vivo* e para melhor entender o dano cerebral apresentado pelos pacientes afetados por PKU, estudamos a atividade da enzima acetilcolinesterase em diferentes estruturas cerebrais de animais que receberam altas concentrações de Phe.

Material e métodos

Animais

Foram utilizados 20 ratos Wistar machos de 30 dias de vida fornecidos pelo Biotério da Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os ratos foram mantidos em ciclos de claro-escuro de ± 12 horas a uma temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Os animais tiveram livre acesso à água e ao alimento. Foram excluídos do estudo todos os animais que eventualmente morrerem. A utilização dos animais seguiu os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (Principles of Laboratory Animal Care, Instituto

Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 85-23, revisada em 1996). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

O descarte dos resíduos biológicos deu-se pelo acondicionamento em saco branco que foi encaminhado e armazenado em freezer nas dependências da universidade. Posteriormente, foram coletados e transportados por uma empresa terceirizada. Os resíduos foram tratados fisicamente e encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Todos os procedimentos estão de acordo com a RDC 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Estudos in vivo

Os animais foram divididos em quatro grupos, constituídos de 5 animais por grupo, como segue:

- Grupo 1 (controle): os animais receberam uma injeção subcutânea de NaCl 0,9 g%;
- Grupo 2: os animais receberam uma injeção subcutânea de Phe na dose de 5,2 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal;
- Grupo 3: os animais receberam uma injeção subcutânea de p-cloro-fenilalanina na dose de 0,9 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal;
- Grupo 4: os animais receberam uma única injeção subcutânea de uma solução contendo Phe na dose de 5,2 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal associada a p-cloro-fenilalanina na dose de 0,9 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal.

Crêterios de Inclusão e Exclusão

Foi incluído no estudo animais saudáveis, do sexo masculino, com 30 dias de vida e que não tinham sido utilizados em estudos anteriores. Foram excluídos do estudo todos os animais que eventualmente morreram durante o tratamento, antecedendo o tempo determinado para a eutanásia dos animais.

Preparações das amostras para análise

Os animais foram mortos 1 hora após a injeção por decapitação com guilhotina e sem anestesia. A caixa craniana foi aberta e o seu conteúdo retirado e, a partir de então, mantido sobre uma placa de vidro a aproximadamente 0 °C. O bulbo olfatório e o tronco cerebral foram desprezados. O córtex cerebral, estriado e hipocampo foram limpos e divididos, sendo retirado o excesso de sangue dos vasos externos. A seguir, será apresentada uma breve descrição da técnica a ser utilizada.

As diferentes estruturas cerebrais foram homogeneizadas isoladamente em tampão contendo fosfato de potássio 150 mM e Triton 1%, pH 7,5. Após a homogeneização, foram centrifugadas a 1.000 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase.

Descrição da técnica utilizada

Determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase: A atividade da enzima acetilcolinesterase foi realizada de acordo com o método descrito por Ellman et al. (1961). Foi avaliada a hidrólise da acetilcolina em uma concentração de 0,8 mM em 1 mL de uma solução contendo 100 mM de tampão fosfato, pH 7,5, e 1 mM de DTNB. Cinquenta microlitros de amostra foram adicionados à solução e pré-incubados por 3 minutos a 25°C. A hidrólise foi monitorada pela formação do ânion tiolato de DTNB a 412 nm por 3 minutos em intervalos de 30 segundos a 25°C. As amostras foram avaliadas em duplicatas e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹. A quantificação de proteína foi realizada segundo o método de Lowry et al. (1951).

Análise estatística

A análise estatística utilizada foi selecionada de acordo com o desenho experimental utilizado e com o tipo de distribuição apresentado pelo conjunto dos dados. Assumindo que os dados tenham uma distribuição normal, para comparação de três ou mais médias foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via para análise dos dados obtidos na determinação dos efeitos bioquímicos das concentrações testados. Caso o conjunto dos dados a ser analisado apresente uma distribuição não-normal, os resultados serão analisados utilizando testes estatísticos não-paramétricos adequados ao desenho experimental utilizado. As análises estatísticas foram feitas pelo programa SPSS versão 17.0. Foram consideradas diferenças significativas quando o valor de $P \leq 0,05$.

Resultados

Inicialmente, investigamos a atividade da enzima acetilcolinesterase em córtex cerebral de ratos jovens submetidos à administração aguda de Phe, p-Cl-Phe ou a combinação destes compostos. Observamos que nenhum destes tratamentos foi capaz de alterar a atividade da enzima acetilcolinesterase no córtex cerebral de ratos. Após, avaliamos a atividade da enzima acetilcolinesterase em estriado de ratos jovens submetidos à administração aguda de Phe, p-Cl-Phe ou destes compostos em combinação. Foi observado que a administração de Phe, bem como de p-Cl-Phe, não se mostrou capaz de alterar a atividade da enzima acetilcolinesterase. Contudo, quando ambos os compostos foram administrados simultaneamente, verificou-se um aumento da atividade da enzima acetilcolinesterase, quando comparado com o grupo controle. Finalmente, avaliamos a atividade da enzima acetilcolinesterase em hipocampo de ratos jovens submetidos à administração aguda de Phe, p-Cl-Phe ou dos dois compostos simultaneamente. Foi observado que nenhum destes tratamentos alterou a atividade da enzima acetilcolinesterase no hipocampo dos animais.

Discussão

Pacientes afetados pela PKU, quando não diagnosticados e tratados precocemente, apresentam um severo retardo mental, danos psicomotores, irritabilidade, pigmentação diminuída da pele, convulsões, vômitos e outros achados. Apesar da gravidade dos sintomas, os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelo dano neurológico nessa doença ainda são pouco conhecidos (Scriver et al., 2001). Sabe-se que a Ach tem um papel importante na neurotransmissão periférica e no sistema nervoso central. Além dos neurônios glutamatérgicos, o hipocampo possui neurônios colinérgicos que formam conexões ricas com inúmeras regiões do cérebro (Hossain et al. 2004). Além disso, uma grande parte da projeção septohipocampal é GABAérgica (Amaral e Kurz 1985) e as aferências septal GABAérgica terminam exclusivamente em interneurônios do hipocampo (Freund e Antal, 1988). Ativação colinérgica deprime respostas excitatórias pelo aumento da liberação de GABA a partir de terminais interneurônio (Pitler e Alger 1992). Sabe-se também que os eventos incluídos na síntese e liberação de Ach exigem acetil coenzima A e energia da mitocôndria em terminais nervosos e que terminação deste efeito depende majoritariamente da atividade da enzima AchE, que catalisa a degradação da acetilcolina.

No presente trabalho, avaliamos a atividade da AchE em diferentes estruturas cerebrais de animais submetidos a administração de Phe, p-Cl-Phe ou a combinação destes. A AChE é uma enzima ligada à membrana com o seu sítio catalítico exposto no folheto externo da bicamada (ectoenzima), que desempenha um importante papel na manutenção da homeostase da sinapse colinérgica. Observamos que a administração aguda de Phe associada a p-Cl-Phe aumentou significativamente os níveis da enzima AchE em estriado, enquanto a administração de Phe ou p-Cl-Phe, isoladamente ou em combinação, não alterou a atividade da enzima acetilcolinesterase em córtex cerebral ou hipocampo dos animais.

Neste sentido, tem sido demonstrado que uma deterioração do equilíbrio colinérgicos pelo aumento da atividade da AChE em ratos provoca declínio neurológico progressivo (Beerl et al., 1995). Dados recentes em ratos submetidos a modelos de doença hepática também sugerem que o acometimento do sistema colinérgico cerebral, causada por desequilíbrio nos níveis de atividade da AChE, pode estar associado a falha na aprendizagem e funções de memória (García-Ayllón et al., 2008). Neste contexto, tanto a memória e comprometimento exploratórias têm sido descritos para os ratos jovens com atividade da AchE aumentada (Navarro et al., 2008), e tem sido demonstrado que o controle da expressão em modelos de doenças neurodegenerativas em ratos jovens recupera o prejuízo à memória (Santacruz et al., 2005), ligando a expressão anormal ao comprometimento comportamental (Brunden et al., 2008). Além disso, foi demonstrado que inibidores da AChE apresentaram eficácia, ainda que baixa, no tratamento dos sintomas cognitivos e funcionais em diferentes modelos experimentais (Martínez et al., 2009).

Até o presente momento, não podemos precisar com exatidão a relevância fisiopatológica deste achado ou o mecanismo pelo qual a AchE apresentou um aumento na sua atividade catalítica. No entanto, considerando que alterações da atividade da AChE são correlacionados com o desenvolvimento de deficiência mental em alguns pacientes (Schulpis et al 2002), podemos sugerir que o aumento da AChE pode contribuir para os distúrbios neurológicos em estágios iniciais. Com base nestes resultados, podemos sugerir também que uma intervenção precoce farmacológica com inibidores da AChE, bem como a otimização da duração do tratamento e avaliação da progressão dos sintomas, possa auxiliar no tratamento da PKU, mais especificamente no sentido de evitar ou reverter os sintomas neurológicos apresentados pelos pacientes.

Concluindo, o presente trabalho demonstrou que a administração de aguda Phe isoladamente não provocou aumento na atividade da enzima acetilcolinesterase em cérebro de ratos, contudo, quando administrada conjuntamente com p-Cl-Phe, levou a um aumento da atividade na enzima do estriado destes animais. Caso estes resultados sejam confirmados por outros trabalhos, poderíamos sugerir que a inibição da atividade da AchE está

envolvida no desenvolvimento do dano neurológico apresentado pelos pacientes afetados pela PKU e que inibidores da AchE possam representar uma nova estratégia terapêutica no intuito de prevenir ou reverter os sintomas cerebrais apresentados por estes pacientes.

Referências

- Barnes CA, Meltzer J, Houston F, Orr G, McGann, K, Wenk GL (2000) Chronic treatment of old rats with donepezil or galantamine : effects on memory, hippocampal plasticity and nicotinic receptors. *Neuroscience*, 99:17-23.
- Burri R, Stefen C, Stiger S, Brodbeck U, Colombo JP, Herschkowitz (1990) N. Reduced myelinogenesis and recovery in hyperphenylalaninemic rats. *Mol Chem Neuropathol*, 13:57-69.
- Campistol J, Lambruschini N, Vilaseca MA, Cambra FJ, Fuste E, Gómez L. Hiperfenilalaninemias. In: Sanjujo P, Baldellou A (eds) (2001) *Diagnostico y tratamiento de las enfermedades metabolicas hereditarias*. Madrid: Ergon, 95-206.
- Clague A, Thomas A (2002) Neonatal biochemical screening for disease. *Clin Chim Acta*, 315:99-110.
- Costabeber E, Kessler A, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Wajner M, Wannmacher CMD (2003) Hyperphenylalaninemia reduces creatine kinase activity in the cerebral cortex of rats. *Int J Dev Neurosci*, 21:111-116.
- Doulgeraki A, Papadopoulou-Daifoti Z, Tsakiris S (2002) Effects of L-phenylalanine on acetylcholinesterase and Na⁺,K⁺-ATPase activities in suckling rat frontal cortex, hippocampus and hypothalamus. *Z Naturforsch C*, 57:182-188. PubMed PMID: 11926533.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V JR, Feather-Stone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7:88-95.
- Fernstrom JD (1994) Dietary amino acids and brain function. *J Am Diet Assoc*, 94:71-77.
- Gimenez-Sanchez G, Childs B, Valle D The effect of mendelian disease on human health. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (2001) *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 8^a ed. New York: McGraw-Hill.

Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H (1999) Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *European J. Biochem.* 264:672-686.

Hagen MEK, Pederzoli CD, Sgaravatti AM, Bridi R, Wajner M, Wannmacher CMD, Wyse ATS, Dutra-Filho CS (2002) Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. *Biochim Biophys Acta*, 1586:344-352.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (2006) *Princípios de bioquímica*. 4ª ed. São Paulo: Sarvier.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193:265-75.

Marchi M, Raiteri M (1996) Nicotinic autoreceptors mediating enhancement of acetylcholine release become operative in conditions of "impaired" cholinergic presynaptic function. *Journal of Neurochemistry*, 67:1974-1981.

Moriguchi S, Marszalec W, Zhao X, Yeh JZ, Narahashi T (2004) Mechanism of action of galantamine on N-methyl-D-aspartate receptors in rat cortical neurons. *Journal of Pharmacology Experimental Therapy*, 310:933-942.

Schulpis KH, Karikas GA, Tjamouranis J, Michelakakis H, Tsakiris S (2002) Acetylcholinesterase activity and biogenic amines in phenylketonuria. *Clinical Chemistry*, 48:1794-1796.

Santos LL, Magalhães MC, Januário JN, Aguiar MJB, Carvalho MRS (2006) The time has come: a new scene for PKU treatment. *Genet Molec Res*, 1:33-34.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (2001) *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 8ª ed. New York: McGraw-Hill.

Scriver CR, Kaufman S. Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (2001) *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 8^a ed. New York: McGraw-Hill, 77:1667-1724.

Streck EL, Edom PT, Noriler ME, Borges LF, Pontes ZL, Parolo E, Dutra-Filho CS, Wannmacher CMD, Wyse ATS (2000) Effect of phenylalanine and p-chlorophenylalanine on Na⁺, K⁺-ATPase activity in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats. *Metab Brain Dis*, 15:105-114.

Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL (2002) *Biochemistry*. 5^a ed. New York: Freeman and Company.

Surtees R, Blau N (2000) The neurochemistry of phenylketonuria. *Eur J Pediatr*, 159:109-113.

Trefz FK, Scheible D, Frauendienst-Egger G, Korall H, Blau N (2005) Long-term treatment of patients with mild an classical phenylketonuria by tetrahydrobiopterin. *Mol Genet Metab*, 86:75-80.

Tsakiris S (2001) Effects of L-phenylalanine on acetylcholinesterase and Na(+), K(+)-ATPase activities in adult and aged rat brain. *Mech Ageing Dev*, 122:491-501. PubMed PMID: 11292514.

Tsakiris S, Schulpis KH, Tjamouranis J, Michelakakis H, Karikas GA. Reduced acetylcholinesterase activity in erythrocyte membranes from patients with phenylketonuria. *Clin Biochem*, 35:615-619.

Van Bakel MME, Printzen G, Wermuth G, Wiesmann UN (2000) Antioxidant and thyroid hormone status in selenium-deficient phenylketonuric and hyperphenylalaninemic patients. *Am J Clin Nutr*, 72:976-981.

Wyse ATS, Sarkis JJF, Cunha-Filho JS, Teixeira MV, Schetinger MR, Wajner M, Wannmacher CMD (1994) Effect of phenylalanine and its metabolites on ATP diphosphohydrolase activity in synaptosomes from rat cerebral cortex. *Neurochem Res*, 19:1175-1180.

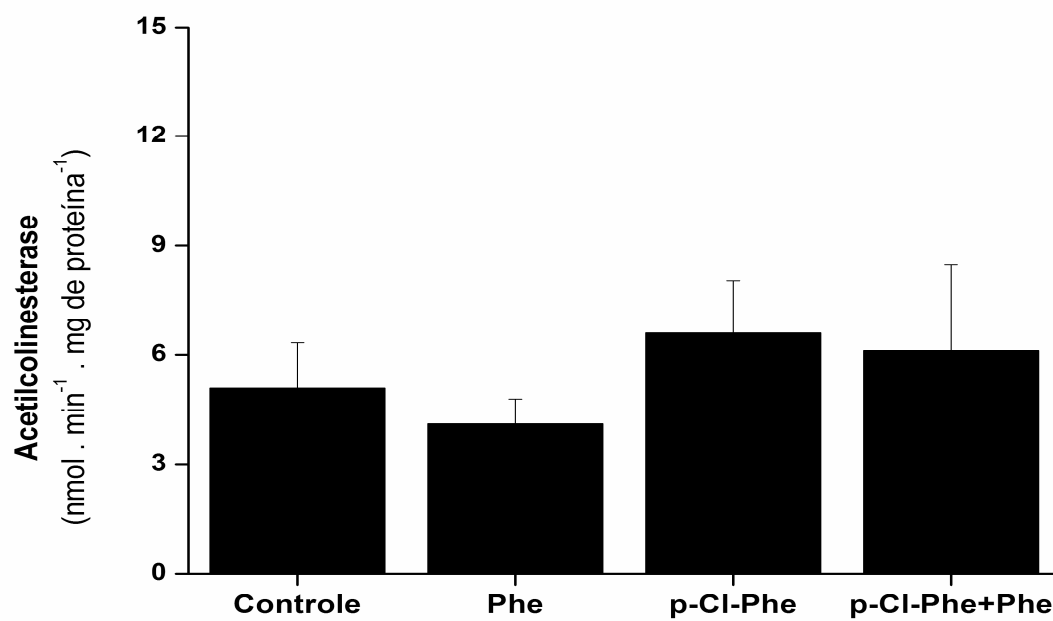


Figura 1: A atividade da enzima acetilcolinesterase em córtex cerebral de ratos jovens submetidos a administração de fenilalanina (Phe) e p-clorofenilalanina (p-Cl-Phe). As barras representam média \pm DP (n = 6). Não houve mudança significativa entre os grupos (ANOVA).

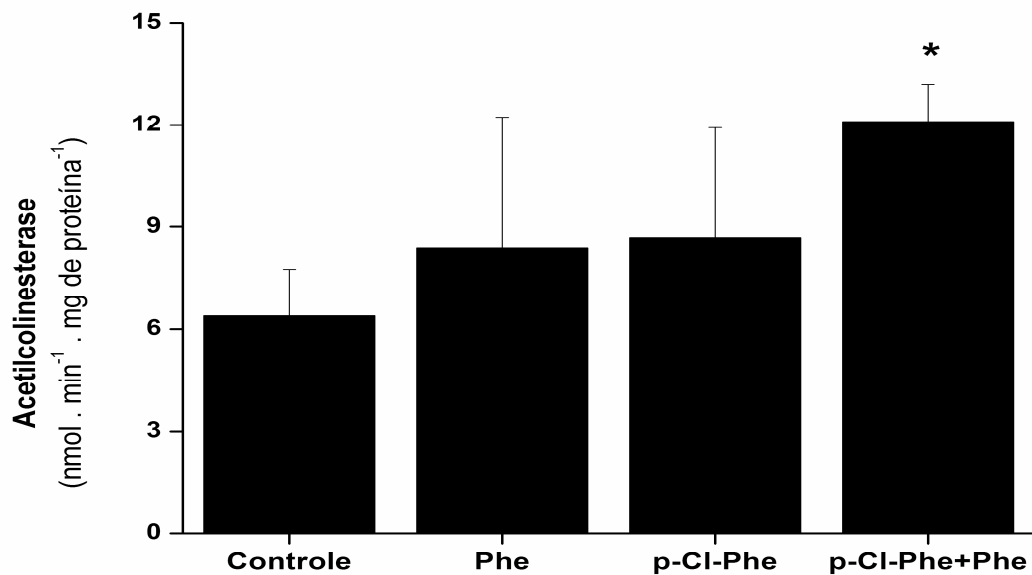


Figura 2: A atividade da enzima acetilcolinesterase em estriado de ratos jovens submetidos a administração de fenilalanina (Phe) e p-clorofenilalanina (p-Cl-Phe). As barras representam média \pm DP (n = 6). * $P < 0,05$, comparado ao grupo controle (ANOVA seguida de post hoc Duncan's).

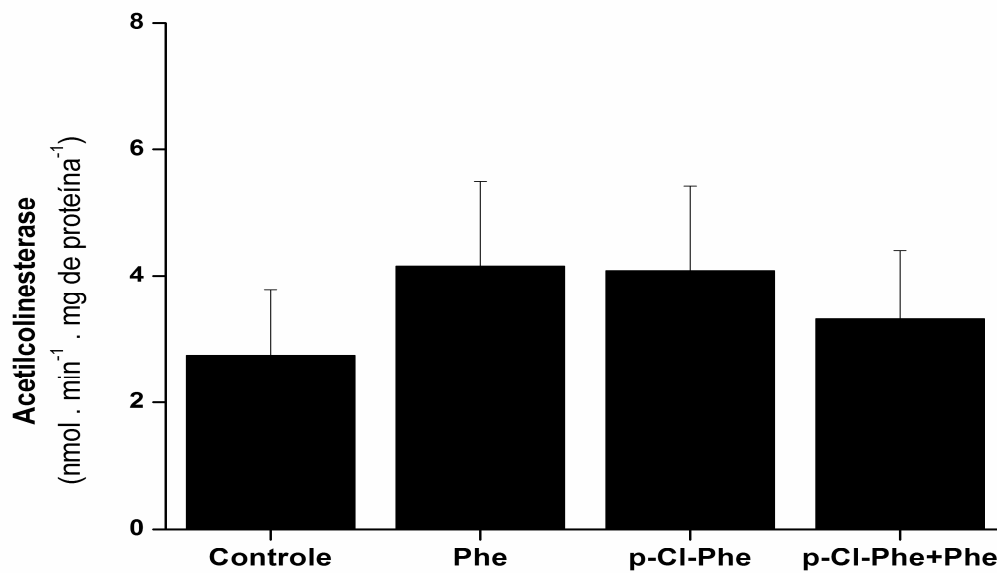


Figura 3 A atividade da enzima acetilcolinesterase em hipocampo de ratos jovens submetidos a administração de fenilalanina (Phe) e p-clorofenilalanina (p-Cl-Phe). As barras representam média \pm DP (n = 6). Não houve mudança significativa entre os grupos (ANOVA).