

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

FERNANDA MALGARIN SILVA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE MARCADORES DE
NEURODEGENERAÇÃO EM PLASMA DE PACIENTES
FENILCETONÚRICOS**

**CRICIÚMA
2016**

FERNANDA MALGARIN SILVA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE MARCADORES DE
NEURODEGENERAÇÃO EM PLASMA DE PACIENTES
FENILCETONÚRICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade do
Extremo Sul Catarinense para
obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia
Fernanda Schuck

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ida Vanessa
Doederlein Schwartz

**CRICIÚMA
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S586a Silva, Fernanda Malgarin.

Avaliação dos níveis de marcadores de neurodegeneração em plasma de pacientes fenilcetonúricos / Fernanda Malgarin Silva ; orientadora : Patrícia Fernanda Schuck ; coorientadora: Ida Vanessa Doederlein Schwartz. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2016.

84p. : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2016.

1. Fenilcetonúria. 2. Neurodegeneração. 3. Fatores de crescimento derivados de plaquetas. 4. Fator neurotrófico derivado do cérebro. I. Título.

CDD 22. ed. 616.042



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

ATA DE Mestrado em Ciências da Saúde – Nº 258

Com início às 15h00 (quinze horas) do dia vinte e sete do mês de julho de 2016 (dois mil e dezesseis), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Fernanda Malgarin Silva**, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a **Patrícia Fernanda Schuck**, intitulada “**Avaliação dos níveis de marcadores de neurodegeneração em plasma de pacientes fenilcetonúricos**”. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof.^a Dr.^a Josiane Budni (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada; Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Prof. Dr. Carlos Severo Dutra Filho (Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 16h00 (dezesseis horas), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza Coordenador do Programa. Criciúma, 27 (vinte e sete) de julho de 2016 (dois mil e dezesseis).

Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Coordenador do PPGCS

Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Coordenador do PPGCS

Diana Ghisi Daniel
Auxiliar Administrativo PPGCS

Diana Ghisi Daniel
Diana Ghisi Daniel
Secretária

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

À minha mãe, que eu amo mais que tudo.

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

A FAPESC/CAPES pela bolsa de mestrado.

A Tassia Tonon e à professora Ida Schwartz pelo auxílio na condução deste trabalho.

Aos meus queridos amigos e colegas do NEUROTOX (os neurotops) e do LEIM, que tornaram os meus dias mais felizes. Obrigada por serem tão legais e, principalmente, por me aceitarem exatamente como eu sou! #melhorlab.

Aos professores Eduardo Rico, Emilio Streck e Samira Valvassori, por serem impecáveis nos momentos de descontração, e por puxarem as nossas orelhas quando necessário.

Às minhas fiéis escudeiras, Bruna e Malu (futuras professoras de bioquímica), pela companhia nos dias/noites/madrugadas na bancada de experimentos e por me apoiarem em qualquer situação. Muito obrigada mesmo, gurias!

Ao professor Gustavo Ferreira, meu primeiro orientador, pelas lições ensinadas até hoje, pelas palavras de incentivo e por me mostrar o que é ciência.

À minha orientadora, professora Patrícia Schuck (ou melhor, Pati), por ter me dado a oportunidade de aprender tanto nos últimos anos. Agradeço do fundo do coração por todo o apoio (na ciência e na vida) e pela confiança que depositastes em mim durante essa trajetória.

A toda a minha família, que ficou torcendo por mim mesmo de longe durante esses anos. Muito obrigada por acreditarem no meu potencial e por me fazerem ter certeza de que no final tudo daria certo. Agradeço em especial aos meus pais, Fátima e Edison, por serem tão especiais e não medirem esforços para proporcionar uma vida maravilhosa para mim e para o meu irmão.

A Deus, por colocar pessoas incríveis no meu caminho, e por nunca me abandonar nos momentos sombrios.

***“A tarefa não é tanto ver aquilo
que ninguém viu, mas pensar o
que ninguém ainda pensou sobre
aquilo que todo mundo vê.”***

Arthur Schopenhauer

RESUMO

A fenilcetonúria (PKU) é um erro inato do metabolismo de herança autossômica recessiva caracterizado bioquimicamente pelo acúmulo do aminoácido fenilalanina (Phe) em tecidos e líquidos biológicos de pacientes. A PKU é causada pela deficiência da atividade da enzima fenilalanina hidroxilase, que catalisa a hidroxilação de Phe à tirosina. A prevalência dessa doença é estimada em 1:10.000 nascidos vivos e suas principais manifestações clínicas são neurológicas, incluindo deficiência intelectual, convulsão, microcefalia, desmielinização e alterações comportamentais. Até o presente momento, os mecanismos fisiopatológicos do dano cerebral encontrado em pacientes acometidos pela PKU não estão completamente estabelecidos. Nesse cenário, o objetivo do presente estudo foi investigar os níveis plasmáticos de marcadores de neurodegeneração em pacientes fenilcetonúricos. Para tanto, amostras de sangue periférico de 14 indivíduos saudáveis (grupo controle) e 24 indivíduos diagnosticados com PKU sob dieta terapêutica (restrição da ingestão de Phe e suplementação de aminoácidos essenciais) pareados por idade e gênero foram coletadas e processadas para obtenção de plasma. Foram avaliados os níveis plasmáticos de Phe, do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), de catepsina D, de mieloperoxidase (MPO), do inibidor do ativador de plasminogênio tecidual-1 (PAI-1), dos fatores de crescimento derivados de plaquetas dos tipos AA (PDGF-AA) e AB/BB (PDGF-AB/BB), da quimiocina regulada sob ativação e secreção de células T (RANTES) e das moléculas de adesão celular neuronal (NCAM), intracelular-1 (ICAM-1) e vascular-1 (VCAM-1). Entre os pacientes com PKU, dois apresentavam microcefalia, quatro apresentavam déficit no desenvolvimento neuropsicomotor e dois apresentavam distúrbio comportamental. Observou-se que os pacientes fenilcetonúricos, mesmo sob tratamento, apresentavam níveis plasmáticos de Phe aumentados quando comparados aos indivíduos do grupo controle. Por outro lado, níveis significativamente reduzidos de BDNF, neurotrofina importante para plasticidade sináptica, sobrevivência celular e processos de memória e aprendizagem, foram observados em plasma de pacientes. Adicionalmente, as concentrações de PDGF-AA e PDGF-AB/BB, fatores de crescimento importantes para a oligodendrogênese e, conseqüentemente, para a mielinização, também encontraram-se diminuídas no grupo de pacientes em comparação aos indivíduos saudáveis. Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente

significativa entre os grupos nos níveis plasmáticos de catepsina D, MPO, PAI-1, RANTES, NCAM, ICAM-1 e VCAM-1. Tomados em conjunto, os resultados apresentados neste trabalho sugerem que alterações na sobrevivência e plasticidade neuronal e prejuízo na oligodendrogênese possam estar envolvidos no dano cognitivo e na hipomielinização apresentados por pacientes acometidos pela PKU.

Palavras-chave: fatores de crescimento derivados de plaquetas; fator neurotrófico derivado do cérebro; fenilalanina; fenilcetonúria; neurodegeneração; oligodendrogênese.

ABSTRACT

High concentrations of phenylalanine (Phe) in tissue and body fluids of patients are the hallmark of phenylketonuria (PKU), an autosomal recessive inborn error of metabolism. PKU occurs due to phenylalanine hydroxylase activity deficiency, which catalyses Phe hydroxylation to Tyr. PKU global prevalence is estimated in 1:10,000 newborns and the main clinical characteristics are neurological, including intellectual disability, seizures, microcephaly, demyelination and behavioral alterations. Until the present moment, the pathophysiology of brain damage found in PKU patients is poorly understood. Therefore, the aim of this study was to evaluate the levels of neurodegeneration markers in plasma of PKU patients. Peripheral blood of 14 healthy individuals (control group) and 24 phenylketonuric patients under diet treatment (restricted Phe intake and aminoacid supplementation) matched by age and sex were collected and processed for plasma obtaining. It was evaluated the levels of Phe, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), cathepsin D, myeloperoxidase (MPO), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), platelet-derived growth factor types AA and AB/BB (PDGF-AA and PDGF-AB/BB), regulated upon activation normal T cells expressed and secreted (RANTES), neural cell adhesion molecule (NCAM), intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). Among patients affected by PKU, two presented microcephaly, four presented neuropsychomotor impairment and two presented behavioral alterations. It was observed that PKU patients, even under treatment, presented elevated plasma level of Phe when compared to control group. On the other hand, significantly reduced levels of BDNF, an important neurotrophin in synaptic plasticity, cell survival and memory and learning processes, were found in patients plasma. Additionally, plasma levels of PDGF-AA and PDGF-AB/BB, important growth factors in oligodendrogenesis and, consequently, in myelination, were also found decreased in patients group when compared with healthy individuals. It was not observed statistically significant difference between groups in cathepsin D, MPO, PAI-1, RANTES, NCAM, ICAM-1 and VCAM-1 plasma levels. Taken together, the present results suggest that alterations in neuronal plasticity and survival, and impairment in oligodendrogenesis might be related with the cognitive damage and hypomyelination found in PKU patients.

Key words: brain-derived neurotrophic factor; neurodegeneration; oligodendrogenesis; phenylalanine; phenylketonuria; platelet-derived growth factor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Metabolismo da fenilalanina.....	19
Figura 2 - Alterações metabólicas envolvidas na fisiopatologia do dano cerebral encontrado em pacientes fenilcetonúricos.....	26
Figura 3 - Via de sinalização do BDNF/TrkB.....	29
Figura 4 - Envolvimento da catepsina D na apoptose.....	31
Figura 5 - Mecanismo indireto de regulação de BDNF via PAI-1.....	32
Figura 6 - Indução da diferenciação de OPC em oligodendrócito via PDGF.....	34
Figura 7 - Papel da mieloperoxidase no estresse oxidativo que pode levar à neurodegeneração.....	36
Figura 8 - Migração de leucócitos do meio vascular para o sítio de inflamação mediada por ICAM-1, VCAM-1 e RANTES.....	38
Figura 9 - Adesão e sinalização celular mediada por NCAM em neurônios.....	39
Figura 10 - Níveis de fenilalanina em plasma de indivíduos controle e pacientes fenilcetonúricos.....	45
Figura 11 - Níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro em plasma de indivíduos controle e pacientes fenilcetonúricos.....	46
Figura 12 - Níveis de fator de crescimento derivado de plaquetas-AA em plasma de indivíduos controle e pacientes fenilcetonúricos.....	46
Figura 13 - Níveis de fator de crescimento derivado de plaquetas-AB/BB em plasma de indivíduos controle e pacientes fenilcetonúricos.....	47
Figura 14 - Marcadores de neurodegeneração avaliados neste trabalho.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos pacientes incluídos neste estudo.....	44
Tabela 2 - Níveis de ICAM-1, catepsina D, MPO, RANTES, NCAM, VCAM-1 e PAI-1 em plasma de indivíduos controle e pacientes fenilcetonúricos.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8OHdG	8-hidroxi-2-deoxiguanosina
AChE	Acetilcolinesterase (do inglês <i>acetylcholinesterase</i>)
AIF	Fator indutor de apoptose (do inglês <i>apoptosis-inducing factor</i>)
AK	Adenilato cinase (do inglês <i>adenilate kinase</i>)
Akt	Proteína cinase B (do inglês <i>Ak thymoma</i>)
ALCN	Aminoácidos longos de cadeia neutra
AMP	Monofosfato de adenosina (do inglês <i>adenosine monophosphate</i>)
ATP	Trifosfato de adenosina (do inglês <i>adenosine triphosphate</i>)
Bax	Proteína X associada a Bcl-2 (do inglês <i>Bcl-2-associated X protein</i>)
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês <i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
BH₂	Di-hidrobiopterina
BH₄	Tetraidrobiopterina
BHE	Barreira hematoencefálica
Bid	Agonista de morte do domínio de interação BH3 (do inglês <i>BH3 interacting-domain death agonist</i>)
CAM	Molécula de adesão celular (do inglês <i>cellular adhesion molecules</i>)
CaMK	Proteína cinase dependente de Ca ²⁺ /calmodulina (do inglês <i>Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase</i>)
CAMKIIα	Proteína cinase II alfa dependente de calmodulina (do inglês <i>calmodulin-dependent protein kinase II-alpha</i>)
CAT	Catalase
CCL5	Quimiocina CC-5 (do inglês <i>chemokine (C-C motif) ligand 5</i>)
CCR1	Receptor de quimiocina CC do tipo 1 (do inglês <i>C-C motif chemokine receptor type 1</i>)
CCR3	Receptor de quimiocina CC do tipo 3 (do inglês <i>C-C motif chemokine receptor type 3</i>)
CCR4	Receptor de quimiocina CC do tipo 4 (do inglês <i>C-C motif chemokine receptor type 4</i>)
CCR5	Receptor de quimiocina CC do tipo 5 (do inglês <i>C-C motif chemokine receptor type 5</i>)
CK	Creatina cinase (do inglês <i>creatine kinase</i>)
CNPase	2'3'-nucleotídeo cíclico 3'-fosfodiesterase (do inglês <i>2'3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase</i>)

CREB	Proteína ligante do elemento responsivo ao AMP cíclico (do inglês <i>cAMP response element-binding protein</i>)
CST	Cerebrosídeo sulfotransferase
DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EC	Comissão de enzimas (do inglês <i>enzyme comission</i>)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês <i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>)
ER	Espécies reativas
ERK	Cinase reguladora de sinal extracelular (do inglês <i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
FAK	Cinase de adesão focal (do inglês <i>focal adhesion kinase</i>)
FYN	Proteína tirosina cinase Fyn (do inglês <i>tyrosine-protein kinase Fyn</i>)
GAB-1	Ligante associado a Grb2 1 (do inglês <i>Grb2-associated binder-1</i>)
GAP43	Proteína associada ao crescimento-43 (do inglês <i>growth associated protein-43</i>)
GPx	Glutaciona peroxidase
Grb2	Proteína ligada ao receptor de fator de crescimento 2 (do inglês <i>Growth factor receptor-bound protein-2</i>)
GSH	Glutaciona reduzida
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
HPA	Hiperfenilalaninemia (do inglês <i>hyperphenylalaninemia</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>high performance liquid chromatography</i>)
ICAM-1	Molécula de adesão celular intracelular-1 (do inglês <i>intracellular cell adhesion molecule-1</i>)
IFN-γ	Interferon-gama
IL-1β	Interleucina-1beta
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível (do inglês <i>inducible nitric oxide synthase</i>)
IP3	Trifosfato de inositol (do inglês <i>inositol triphosphate</i>)
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LTP	Potenciação de longa duração (do inglês <i>long-term potentiation</i>)
MBP	Proteína básica de mielina (do inglês <i>myelin basic protein</i>)
MEK	Cinase da proteína ativada por mitógeno cinase (do inglês <i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>)

MMPs	Metaloproteinases de matriz
MPO	Mieloperoxidase
NADPH reduzido	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NCAM	Molécula de adesão celular neuronal (do inglês <i>neuronal cell adhesion molecule</i>)
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B (do inglês <i>nuclear transcription factor kappa B</i>)
NO	Óxido nítrico (do inglês <i>nitric oxide</i>)
Olig2	Fator de transcrição da linhagem de oligodendrócitos 2 (do inglês <i>oligodendrocyte transcription factor 2</i>)
OMIM	Herança mendeliana em homens online (do inglês <i>online mendelian inheritance in man</i>)
OPC	Célula progenitora de oligodendrócito (do inglês <i>oligodendrocyte progenitor cell</i>)
PAH	Fenilalanina hidroxilase (do inglês <i>phenylalanine hydroxylase</i>)
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio-1 (do inglês <i>plasminogen activator inhibitor-1</i>)
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês <i>platelet-derived growth factor</i>)
PDGFR-α	Receptor tirosina cinase de PDGF do tipo alfa (do inglês <i>platelet-derived growth factor receptor-alpha</i>)
PDGFR-β	Receptor tirosina cinase de PDGF do tipo beta (do inglês <i>platelet-derived growth factor receptor-beta</i>)
PDK1	Proteína cinase dependente de 3-fosfoinosítido 1 (do inglês <i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1</i>)
pERK	Cinase reguladora de sinal extracelular fosforilada (do inglês <i>phosphorylated extracellular signal-regulated kinase</i>)
Phe	Fenilalanina (do inglês <i>phenylalanine</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol-3 cinase (do inglês <i>phosphatidylinositol-3 kinase</i>)
PK	Piruvato cinase (do inglês <i>pyruvate kinase</i>)
PKC	Proteína cinase C (do inglês <i>protein kinase C</i>)
PKCβII	Proteína cinase C beta-2 (do inglês <i>protein kinase C beta-II</i>)
PKU	Fenilcetonúria (do inglês <i>phenylketonuria</i>)
PLCγ	Fosfolipase C-gama (do inglês <i>phospholipase C gamma</i>)
QI	Quociente de inteligência
Raf	Proteína de fibrossarcoma acelerado rapidamente (do inglês <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>)

RANTES Quimiocina regulada sob ativação e secreção de células T (do inglês *regulated upon activation, normal T cells expressed and secreted*)

Ras Proteína de sarcoma de rato (do inglês *rat sarcoma*)

Rho Família de genes homólogos a *Ras* (do inglês *ras homolog family member*)

RhoA Família de genes homólogos a *Ras*, membro A (do inglês *ras homolog family member A*)

RPTP α Proteína tirosina fosfatase- α do tipo receptor (do inglês *receptor-type Tyr-protein phosphatase-alpha*)

SDH Succinato desidrogenase (do inglês *succinate dehydrogenase*)

Shc Domínio de homologia sarcoma (do inglês *Src homology 2 domain*)

SNC Sistema nervoso central

SOD Superóxido dismutase

Sos Proteína “filha” do gene *sevenless* (do inglês *son of sevenless*)

TBA-RS Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês *thiobarbituric acid-reactive species*)

tBid Agonista de morte do domínio de interação BH3 truncado (do inglês *truncated BH3 interacting-domain death agonist*)

TNF- α Fator de necrose tumoral-alfa (do inglês *tumor necrosis factor-alpha*)

t-PA Ativador de plasminogênio tecidual (do inglês *tecdial-plasminogen activator*)

TrkB Receptor de tropomiosina cinase B (do inglês *tropomyosin-related kinase B*)

VCAM-1 Molécula de adesão celular vascular-1 (do inglês *vascular cell adhesion molecule-1*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 FENILCETONÚRIA	19
1.1.1 Manifestações clínicas	20
1.1.2 Diagnóstico	21
1.1.3 Tratamento	21
1.1.4 Fisiopatologia	22
1.2 NEURODEGENERAÇÃO	27
1.2.1 Moléculas envolvidas na neurodegeneração	27
1.2.1.1 Proteínas envolvidas na morte/sobrevivência celular	27
1.2.1.1.1 <i>Fator neurotrófico derivado do cérebro</i>	27
1.2.1.1.2 <i>Catepsina D</i>	30
1.2.1.1.3 <i>Inibidor do ativador de plasminogênio-1</i>	31
1.2.1.1.4 <i>Fatores de crescimento derivados de plaquetas</i>	33
1.2.1.2 Moléculas envolvidas na neuroinflamação	34
1.2.1.2.1 <i>Mieloperoxidase</i>	34
1.2.1.2.2 <i>Quimiocina regulada sob ativação e secreção de células T</i> ..	36
1.2.1.2.3 <i>Moléculas de adesão celular</i>	37
1.3 JUSTIFICATIVA	39
2 OBJETIVOS	40
2.1 OBJETIVO GERAL	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 TIPO DE ESTUDO	41
3.2 AMOSTRAS	41
3.2.1 Preparo de amostras	41
3.2.2 Medida dos níveis plasmáticos de Phe	42
3.3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE NEURODEGENERAÇÃO	42
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4 RESULTADOS	44
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO A	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 FENILCETONÚRIA

Altas concentrações de fenilalanina (Phe) são observadas em líquidos e tecidos biológicos de pacientes acometidos pela fenilcetonúria (PKU; OMIM 261600), um erro inato do metabolismo de herança mendeliana com padrão autossômico recessivo. Os primeiros relatos dessa doença foram feitos pelo médico norueguês Asbjørn Følling no ano de 1934, que observou elevadas quantidades de ácido fenilpirúvico, um metabólito da Phe, na urina de duas crianças que apresentavam deficiência intelectual, problemas motores e anormalidades na pele (Følling, 1934; Christ, 2003). Essa aminoacidopatia é caracterizada bioquimicamente pela hiperfenilalaninemia (HPA), resultado da inabilidade de metabolização da Phe, que ocorre devido à deficiência ou ausência da enzima hepática fenilalanina hidroxilase (PAH; EC 1.14.16.1) ou de seu cofator, a tetraidrobiopterina (BH_4), que catalisam a hidroxilação de Phe a tirosina (Figura 1). Devido à deficiência dessa reação enzimática, há diminuição dos níveis de tirosina nos líquidos biológicos e tecidos dos pacientes (Scriver et al., 2001).

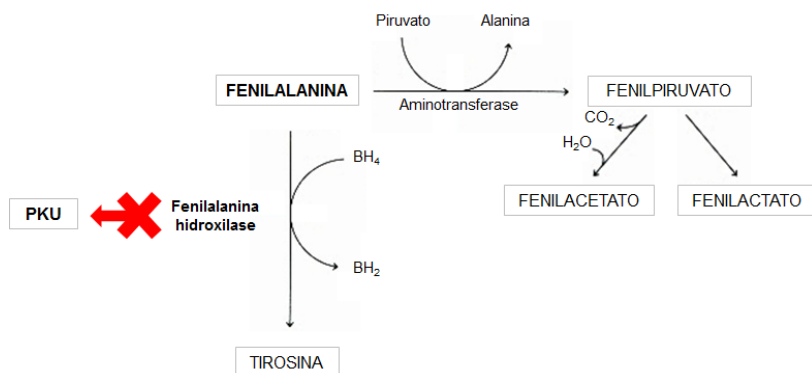


Figura 1 – Metabolismo da fenilalanina. Fisiologicamente, a fenilalanina é hidroxilada à tirosina através da ação da enzima hepática fenilalanina hidroxilase, com o auxílio do cofator BH_4 . A deficiência parcial ou total da atividade desta enzima leva ao acúmulo de fenilalanina e de seus metabólitos secundários fenilpiruvato, fenilacetato e fenilactato em tecidos e líquidos biológicos de pacientes acometidos pela PKU. Abreviações: BH_2 - di-hidrobiopterina; BH_4 - tetraidrobiopterina; PKU - fenilcetonúria. Fonte: modificado de Nelson e Cox, 2014.

O gene *PAH*, que codifica a enzima de mesmo nome, está localizado no braço longo do cromossomo 12, na posição 23.2 (Genetics Home Reference, 2016). Até o momento, mais de 950 polimorfismos foram identificados neste gene, ocasionando deficiência parcial ou total de atividade enzimática, sendo que atividades residuais menores do que 1% caracterizam a forma mais grave e mais frequente de PKU (Blau, 2016).

Apesar de ser considerada uma doença rara, a PKU é um dos erros inatos do metabolismo mais frequentes e possui uma prevalência média global estimada em um caso para cada 10.000 nascidos vivos (Mitchell et al., 2011; Saudubray et al., 2012). No Brasil, um estudo realizado em 2001 demonstrou uma prevalência de 1:15.839 recém-nascidos (Carvalho, 2003).

1.1.1 Manifestações clínicas

Os pacientes fenilcetonúricos são normais ao nascimento. O atraso no desenvolvimento, primeiro sinal evidente, pode aparecer até o primeiro ano de idade e progride para deficiência intelectual grave (quociente de inteligência - $QI \leq 50$) (Saudubray et al., 2012). Adicionalmente, os pacientes podem apresentar convulsões, microcefalia, ataxia e déficit no desenvolvimento motor (Blau et al., 2010), além de sintomas psiquiátricos, neurocognitivos e alterações comportamentais durante a infância e a vida adulta (Bilder et al., 2013). Crianças com PKU tratadas precocemente mostram uma alta incidência de ansiedade, depressão, isolamento social e hiperatividade (Smith et al., 1988; Burgard et al., 1994; Weglage et al., 2000; Channon et al., 2004), enquanto adultos geralmente desenvolvem ansiedade, fobia, obsessão/compulsão, depressão, paranoia e recusa alimentar (Waisbren e Levy, 1991; Burgard et al., 1994; Pietz et al., 1997; Ris et al., 1997; Antisdell e Chrisler, 2000; Koch et al., 2002). Além disso, o prejuízo da função executora e do processamento rápido vem sendo relacionado com os altos níveis de Phe em crianças e adultos fenilcetonúricos (Ris et al., 1994; Arniold et al., 1998; Christ et al., 2006; Anderson et al., 2007).

Outros achados incluem hipomielinização devido ao prejuízo da substância branca periventricular em cérebro de pacientes fenilcetonúricos, que pode se estender para as regiões subcortical e frontal nos casos mais graves (Anderson e Leuzzi, 2010), e despigmentação dos cabelos, olhos e pele devido à diminuição na

síntese de melanina, metabólito sintetizado a partir de tirosina (Blau et al., 2010).

1.1.2 Diagnóstico

No Brasil, o diagnóstico de PKU é realizado por meio de triagem neonatal básica obrigatória, conhecida como “teste do pezinho”, disponibilizada pelo Sistema Único de Saúde em todos os estados brasileiros (BRASIL, 2001). A coleta de sangue deve ser realizada entre o 2º e o 5º dia após o nascimento, com exposição prévia da criança ao leite materno. Recém-nascidos com nível plasmático elevado de Phe devem ser encaminhados para avaliação diagnóstica, conforme recomendado pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal do Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2013).

Os métodos laboratoriais preconizados para identificação de níveis de Phe em amostras de plasma, soro ou urina são espectrometria de massa em tandem, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa e ensaios fluorimétricos (Blau et al., 2011). O resultado positivo de rastreamento para PKU ocorre quando o nível plasmático de Phe estiver acima do ponto de corte (2 mg/dL) e deve ser confirmado por uma segunda análise quantitativa dos níveis dos aminoácidos Phe e tirosina. Além disso, deve-se avaliar a excreção urinária dos metabólitos fenilpiruvato, fenilactato e fenilacetato (Burgard et al., 2009). Embora a análise molecular para identificação dos polimorfismos da PAH não seja obrigatória para o diagnóstico, pode auxiliar na detecção de heterozigotos, diagnóstico pré-natal e aconselhamento genético, bem como no acompanhamento e prognóstico da doença (Ministério da Saúde, 2013; Blau et al., 2014).

1.1.3 Tratamento

A estratégia terapêutica preconizada para os pacientes com PKU é a restrição dietética de Phe, que deve ser iniciada imediatamente após o diagnóstico e mantida durante toda a vida do paciente (Feillet e Agostoni, 2010). O tratamento é realizado através da redução do consumo de alimentos proteicos e suplementação de fórmula especial que contenha uma mistura de aminoácidos, vitaminas, minerais e baixo teor de Phe, visto que esta não pode ser excluída da dieta por ser um aminoácido essencial. O tratamento dietético é monitorado pela frequente avaliação dos níveis plasmáticos e urinários de Phe e deve ser implementado de forma individual, respeitando-se a tolerância à Phe e a

atividade residual da enzima em cada paciente (Poustie e Wildgoose, 2010; Casey, 2013).

Apesar de auxiliar na prevenção do prejuízo no desenvolvimento cognitivo em pacientes fenilcetonúricos, o manejo da dieta é difícil. A não adesão ao tratamento, principalmente devido à desagradável palatabilidade da fórmula, é comum especialmente em pacientes adolescentes e pode resultar em dano ao sistema nervoso central (SNC) (MacLeod e Ney, 2010; MacDonald et al., 2012). Em alguns casos, é realizada a suplementação de aminoácidos longos de cadeia neutra (ALCN) e/ou de tetraidrobiopterina (BH₄) como adjuvantes à dieta (Strisciuglio e Concolino, 2014).

1.1.4 Fisiopatologia

Apesar de a Phe se acumular sistemicamente, os principais sinais e sintomas apresentados pelos pacientes fenilcetonúricos são neurológicos (Weglage et al., 1995), cujos mecanismos moleculares não estão completamente estabelecidos. Entretanto, a neurotoxicidade da Phe e de seus metabólitos secundários parece ser um fator primordial, desencadeando significativas alterações metabólicas e neuroquímicas (Schuck et al., 2015).

Nesse sentido, o transportador de ALCN tem como função transportar, além da Phe, outros aminoácidos através da barreira hematoencefálica (BHE), tais como tirosina, triptofano, leucina, isoleucina e valina (Pardridge, 1998). O acúmulo de Phe nos tecidos dos pacientes com PKU ocasiona um aumento do aporte cerebral de Phe concomitantemente com uma diminuição dos níveis cerebrais de outros ALCN indispensáveis para a síntese proteica ou precursores de neurotransmissores (van Spronsen et al., 2009; Gentile et al., 2010; Imperlini et al., 2014). Estudos demonstraram que o aumento das concentrações plasmáticas de Phe é diretamente proporcional à deficiência da síntese de neurotransmissores como dopamina, noradrenalina, serotonina e melatonina em pacientes (McKean, 1972; Butler et al., 1981; Güttler e Lou, 1986; Lykkelund et al., 1988; Antoshechkin et al., 1991; Burlina et al., 2000) e em modelos animais de PKU (Puglisi-Allegra et al., 2000; Pascucci et al., 2002), onde os autores relatam que tal fato poderia colaborar para o déficit cognitivo apresentado por pacientes fenilcetonúricos.

Adicionalmente, alterações do metabolismo de proteínas e lipídeos também estariam relacionadas à hipomielinização apresentada por pacientes acometidos por PKU sem tratamento adequado (Clearly et

al., 1994; Dyer, 1999). Estudos anteriores mostram que altas concentrações de Phe inibem a produção da proteína básica de mielina e alteram a atividade das enzimas cerebrosídeo sulfotransferase (CST; EC 2.8.2.11), 2'3'-nucleotídeo cíclico 3'-fosfodiesterase (CNPase; EC 3.1.4.37) e ATP-sulfurilase (EC 2.7.7.4), que são reguladoras da mielinogênese (Alejandre et al., 1984; Burri et al., 1990a,b; Hommes, 1991; Reynolds et al., 1992). Além disso, foram encontradas alterações nos processos de alongação e dessaturação de ácidos graxos, especialmente de esfingomielina e hidroxicerebrosídeo (componentes da mielina), em cérebro de ratos submetidos a um modelo experimental de HPA (Huether et al., 1986). Outros estudos também relataram a inibição das enzimas 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase (EC 1.1.1.34) e mevalonato-5-pirofosfato descarboxilase (EC 4.1.1.33), envolvidas na biossíntese do colesterol, em cérebro de animais expostos a altas concentrações de Phe (Castillo et al., 1988; Shefer et al., 2000). Nesse contexto, alguns estudos sugerem que a hipomielinização pode estar envolvida no prejuízo cognitivo apresentado por pacientes fenilcetonúricos (Surtees e Blau, 2000; van Spronsen et al., 2009; Anderson e Leuzzi, 2010).

Alterações metabólicas adicionais incluem prejuízo na homeostase energética em amostras cerebrais de modelos animais de HPA e amostras sanguíneas de pacientes com PKU. Nesse contexto, altas concentrações de Phe causam inibição da atividade do complexo I-III da cadeia transportadora de elétrons, das enzimas succinato desidrogenase (SDH; EC 1.3.5.1), creatina cinase (CK; EC 2.7.3.2) e piruvato cinase (PK; EC 2.7.1.40) em córtex cerebral de animais submetidos a um modelo experimental de HPA (Feksa et al., 2002; Rech et al., 2002; Costabeber et al., 2003). Adicionalmente, Bortoluzzi et al. (2014) demonstraram que a suplementação de piruvato e creatina em ratas expostas à HPA durante a gestação e lactação preveniu a inibição das enzimas CK citosólica e mitocondrial, bem como a inibição da adenilato cinase (AK; EC 2.7.4.3) encontrada no cérebro da prole com 21 dias de vida. Além disso, os níveis de ubiquinona 10 (coenzima Q10), molécula importante na transferência de elétrons na mitocôndria, foram diminuídos em sangue de pacientes fenilcetonúricos (Artuch et al., 1999), sendo correlacionados negativamente com a concentração plasmática de Phe (Artuch et al., 2001).

A participação do estresse oxidativo na fisiopatologia do dano cerebral apresentado por pacientes fenilcetonúricos tem sido extensamente descrita. O tecido cerebral é particularmente sensível ao ataque de espécies reativas (ER) devido a fatores como alta demanda de

oxigênio, alta concentração de íons ferro, níveis diminuídos de defesas antioxidantes em comparação a outros tecidos e o metabolismo da dopamina, que libera ER (Halliwell e Gutteridge, 2015). Estudos prévios demonstraram o aumento de dano oxidativo a biomoléculas em amostras de pacientes fenilcetonúricos de maneira dependente da concentração de Phe. Schulpis et al. (2005a) e Sitta et al. (2009a) compararam marcadores de dano ao DNA em sangue periférico de pacientes com PKU que aderiam e que não aderiam adequadamente à dieta terapêutica. Esses autores observaram que os níveis de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8OHdG), marcador específico de dano oxidativo a ácidos nucleicos, e que o índice de dano ao ácido desoxirribonucleico (DNA), medido através do teste cometa, eram maiores nos indivíduos que apresentavam níveis mais elevados de Phe. Resultados semelhantes foram observados no estado e na reatividade antioxidante total do tecido de pacientes fenilcetonúricos (Schulpis et al., 2005a; Sitta et al., 2009b).

Além disso, os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), indicadores de lipoperoxidação, e o conteúdo de grupos sulfidríla e carbonila, marcadores de dano oxidativo a proteínas, encontraram-se alterados em plasma de pacientes fenilcetonúricos diagnosticados tardiamente, quando comparados a pacientes diagnosticados precocemente e indivíduos não fenilcetonúricos (Sitta et al., 2009c). Diversos autores também demonstraram uma diminuição dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e da atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx; EC 1.11.1.9) em eritrócitos de indivíduos com PKU (Sirtori et al., 2005; Sitta et al., 2006; Sitta et al., 2009c), bem como aumento das atividades da catalase (CAT; EC 1.11.1.6) e da superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) (Sanayama et al., 2011), o que demonstra alteração no sistema antioxidante não enzimático e enzimático em pacientes com PKU.

Recentemente, Deon et al. (2015) observaram níveis elevados de citocinas de caráter pró-inflamatório, tais como interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em plasma de indivíduos fenilcetonúricos. Resultados semelhantes foram encontrados em animais nocaute para o gene *PAH*, que apresentaram aumento na concentração plasmática de IL-1 β e de interferon-gama (IFN- γ) (Solverson et al., 2012).

Sob o aspecto neuroquímico, estudos anteriores demonstraram que a alta concentração de Phe em cultura primária de neurônios levou à diminuição dos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o que contribuiu para morte neuronal através da ativação de vias de sinalização apoptóticas, e prejuízo na maturação de neuritos

(Zhang et al., 2007; Li et al., 2010; Zhang et al., 2010). Schulpis et al. (2004) investigaram os níveis da proteína S100 β , indicadora de dano ao SNC, em soro de pacientes com PKU que aderiram ou não à dieta. Os resultados obtidos indicaram uma correlação positiva entre a concentração sérica de Phe, os níveis de S100 β e as lesões cerebrais nos pacientes que não aderiram à dieta terapêutica, demonstrando a importância da implementação correta do tratamento. Além disso, a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) (EC 3.1.1.7), envolvida na transmissão colinérgica e que exerce papel fundamental em funções cognitivas como percepção, aprendizagem e memória (Yu e Dayan, 2002), foi inibida em eritrócitos de pacientes fenilcetonúricos que não aderiram à dieta, quando comparados àqueles que faziam a adesão dietética e a indivíduos controle (Tsakiris et al., 2002). Adicionalmente, Bedin et al. (2001) observaram diminuição da atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase (EC 3.6.1.3), responsável pelo transporte ativo de íons Na⁺ e K⁺ através da membrana celular e essencial para a manutenção do gradiente iônico, em eritrócitos de pacientes fenilcetonúricos comparados com indivíduos saudáveis. Acredita-se que estes achados podem refletir um passo importante na neurodegeneração que leva ao dano cognitivo apresentado por pacientes com PKU.

As alterações metabólicas anteriormente citadas e envolvidas na fisiopatologia do dano cerebral encontrado em pacientes fenilcetonúricos estão ilustradas na figura 2.

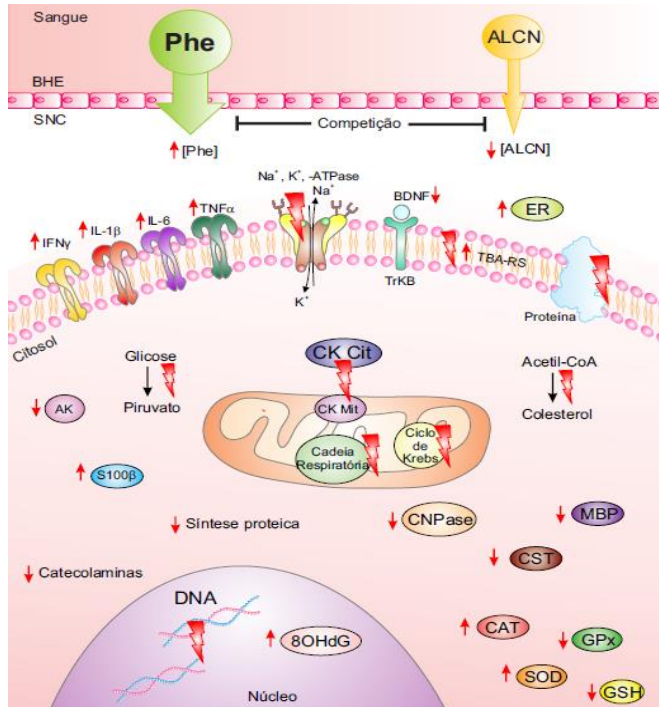


Figura 2 – Alterações metabólicas envolvidas na fisiopatologia do dano cerebral encontrado em pacientes fenilcetonúricos. Altas concentrações de Phe ocasionam um aumento do aporte cerebral de Phe concomitantemente com uma diminuição dos níveis cerebrais de outros ALCN, devido à competição que exercem pelo mesmo transportador na BHE. A baixa concentração de ALCN no SNC leva à diminuição da síntese proteica e da produção de neurotransmissores. A alta concentração de Phe no SNC, por sua vez, acarreta o aumento de citocinas pró-inflamatórias e da proteína S100 β , além de diminuição de BDNF e de proteínas essenciais para a mielinização. Adicionalmente, o acúmulo de Phe leva à alteração da homeostase energética, da biossíntese do colesterol, da manutenção do gradiente iônico e induz estresse oxidativo, que ocasiona dano à lipídeos, proteínas e DNA. 8OHdG - 8-hidroxi-2-deoxiguanosina; AK - adenilato cinase; ALCN - aminoácidos longos de cadeia neutra; BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro; BHE - barreira hematoencefálica; CAT - catalase; CK - creatina cinase; DNA - ácido desoxirribonucleico; ER - espécies reativas; GPx - glutatona peroxidase; GSH - glutatona reduzida; IFN- γ - interferon-gama; IL-1 β - interleucina 1-beta; IL-6 - interleucina-6; MBP - proteína básica de mielina; Phe - fenilalanina; PK - piruvato cinase; SNC - sistema nervoso central; SOD - superóxido dismutase; TBA-RS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; TNF- α - fator de necrose tumoral alfa; TrkB - receptor de tropomiosina cinase B. Fonte: autora.

Visto que os principais sintomas apresentados por pacientes com PKU são neurológicos, e que a fisiopatogenia desses sintomas não está completamente elucidada, faz-se necessária a investigação de parâmetros de neurodegeneração em amostras de indivíduos acometidos por esta doença. Assim, acredita-se que o melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos da PKU pode ser de grande valia no intuito de colaborar para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e melhora da qualidade de vida dos pacientes fenilcetonúricos.

1.2 NEURODEGENERAÇÃO

A perda e a disfunção progressiva de neurônios no SNC caracterizam o processo de neurodegeneração (Bredesen et al., 2006). Alguns mecanismos propostos para o desenvolvimento do fenômeno neurodegenerativo incluem processos inflamatórios crônicos (Amor et al., 2010), ativação de vias apoptóticas (Mattson, 2000; Okouchi et al., 2007; Ghavami et al., 2014), estresse oxidativo (Andersen, 2004; Uttara et al., 2009; Gandhi e Abramov, 2012), excitotoxicidade (Salińska et al., 2005; Dong et al., 2009), disfunção mitocondrial (Federico et al., 2012; Hroudová et al., 2014) e, recentemente, alterações em oligodendrócitos (Liu e Zhou, 2013).

1.2.1 Moléculas envolvidas na neurodegeneração

1.2.1.1 Proteínas envolvidas na morte/sobrevivência celular

1.2.1.1.1 Fator neurotrófico derivado do cérebro

Purificado e identificado pela primeira vez em 1982, o BDNF foi a segunda neurotrofina a ser descoberta (Barde et al., 1982). O BDNF e seu receptor tropomiosina cinase B (TrkB) de alta afinidade representam a via de sinalização neurotrófica mais expressa no SNC (Friedman et al., 1991; Guthrie e Gall, 1991; Gall et al., 1992; Castren et al., 1995; Yan et al., 1997) e seu papel na aprendizagem e na memória está largamente estabelecido (Minichiello, 2009; Park e Poo, 2013). Além disso, durante o desenvolvimento e na fase adulta de humanos, o BDNF exerce papel essencial na sobrevivência, diferenciação e maturação de células neuronais, além de contribuir para a formação de sinapses e plasticidade sináptica (Huang e Reichardt, 2001; Carter et al., 2002) (Figura 3).

Estudos anteriores observaram diminuição nos níveis de BDNF em doenças neurodegenerativas, tais como as doenças de Parkinson, Alzheimer e Huntington (Siegel e Chauhan, 2000; Ciammola et al., 2007; Zucatto e Cattaneo, 2009; Scalzo et al., 2010) e em erros inatos do metabolismo (Ferreira et al., 2011; Matté et al., 2009; Vairo et al., 2015), incluindo a PKU (Zhang et al., 2007; Li et al., 2010; Zhang et al., 2010).

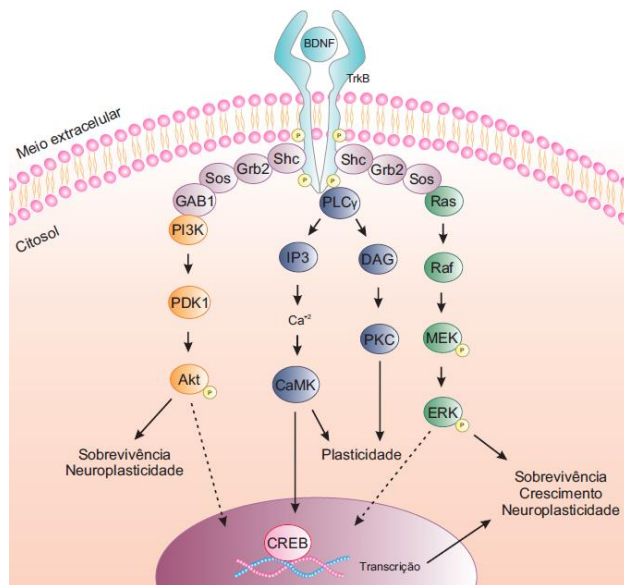


Figura 3 – Via de sinalização do BDNF/TrkB. Ao se ligar ao domínio extracelular do receptor TrkB, o BDNF induz a dimerização e ativação do domínio intracelular tirosina cinase, resultando na autofosforilação dos resíduos de tirosina do receptor. Assim, ocorre a interação com proteínas adaptadoras e ativação de cascatas de sinalização intracelular, incluindo as vias Ras, PI3K/Akt e PLC γ . A fosforilação do resíduo tirosina 515 do receptor TrkB leva ao recrutamento da proteína adaptadora Shc, seguida do recrutamento de Grb2 e Sos, e ativação da via Ras (à direita). Shc-Grb2 também pode recrutar GAB1 e ativar a via PI3K/Akt (à esquerda). A fosforilação do resíduo tirosina 816 resulta no recrutamento de PLC γ , que leva à formação de IP3 e regulação de Ca⁺² intracelular, e DAG, que ativa CaMK e PKC (ao centro). As moléculas geradas nessas vias de sinalização induzem a ativar CREB, dentro do núcleo e, assim, controlam diferentes aspectos da função celular, incluindo plasticidade sináptica, sobrevivência e crescimento e/ou diferenciação. Abreviações: Akt - proteína cinase B; BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro; CaMK - proteína cinase dependente de Ca⁺²/calmodulina; CREB - proteína ligante do elemento responsivo ao AMP cíclico; DAG - diacilglicerol; ERK - cinase reguladora de sinal extracelular; GAB-1 - ligante associado a Grb2 1; Grb2 - proteína ligada ao receptor de fator de crescimento 2; IP3 - trifosfato de inositol; MEK - cinase da proteína ativada por mitógeno cinase; PDK1 - proteína cinase dependente de 3-fosfoinositídeo 1; PI3K - fosfatidil inositol-3 cinase; PKC - proteína cinase C; PLC γ - fosfolipase C-gama; Raf - proteína de fibrossarcoma acelerado rapidamente Ras - proteína de sarcoma de rato; Shc - domínio de homologia sarcoma; Sos - proteína “filha” do gene sevenless; TrkB - receptor de tropomiosina cinase B. Fonte: modificado de Duman e Voleti, 2012.

1.2.1.1.2 *Catepsina D*

A catepsina D (EC 3.4.23.5) é uma endopeptidase aspártica lisossomal sintetizada no retículo endoplasmático rugoso a partir da clivagem de pró-catepsina D (Hasilik e Neufeld, 1980; Kornfeld, 1990). As funções fisiológicas dessa protease incluem a clivagem de proteínas e peptídeos estruturais e funcionais, incluindo a degradação metabólica de proteínas intracelulares (Bańkowska et al., 1997; Benes et al., 2008), a ativação e degradação de hormônios e fatores de crescimento polipeptídicos (Dunn et al., 1991; Authier et al., 1995; Takei et al., 1997; Kudo et al., 1999; Piwnica et al., 2004), a ativação de precursores enzimáticos (Nishimura et al., 1988; Nishimura et al., 1989; van der Stappen et al., 1996), o processamento de ativadores e inibidores enzimáticos (Hiraiwa et al., 1997; Lenarcic et al., 1991; Pimenta et al., 2000) e a regulação da morte celular por apoptose (Heinrich et al., 2004; Haendeler et al., 2005). Após a indução da apoptose, a permeabilização da membrana lisossomal resulta na liberação de catepsina D para o citosol, o que ocasiona disfunção mitocondrial e consequente morte celular (Chwieralski et al., 2006; Liaudet-Coopman et al., 2006). No citosol, a catepsina D faz a clivagem do agonista de morte do domínio de interação BH3 (Bid) em Bid truncado (tBid), que, posteriormente, induz a ativação da proteína X associada a Bcl-2 (Bax), molécula que se insere na membrana mitocondrial e induzir a abertura de poros de transição (Heinrich et al., 2004). A consequente liberação de citocromo *c* para o citoplasma ativa as caspases 3 e 9, induzindo apoptose (McIlwain et al., 2015). Alternativamente, a catepsina D pode ativar Bax independentemente da interação com Bid, resultando na liberação do fator indutor de apoptose (AIF) e consequente apoptose independente de caspases (Bidère et al., 2003) (Figura 4).

Estudos prévios demonstraram o envolvimento da catepsina D em doenças neurodegenerativas, como as doenças de Huntington (Kegel et al., 2000; Kim et al., 2006), Alzheimer (Saftig et al., 1996) e Parkinson (Cullen et al., 2009), e em doenças neuroinflamatórias, como esclerose lateral amiotrófica (Wootz et al., 2006).

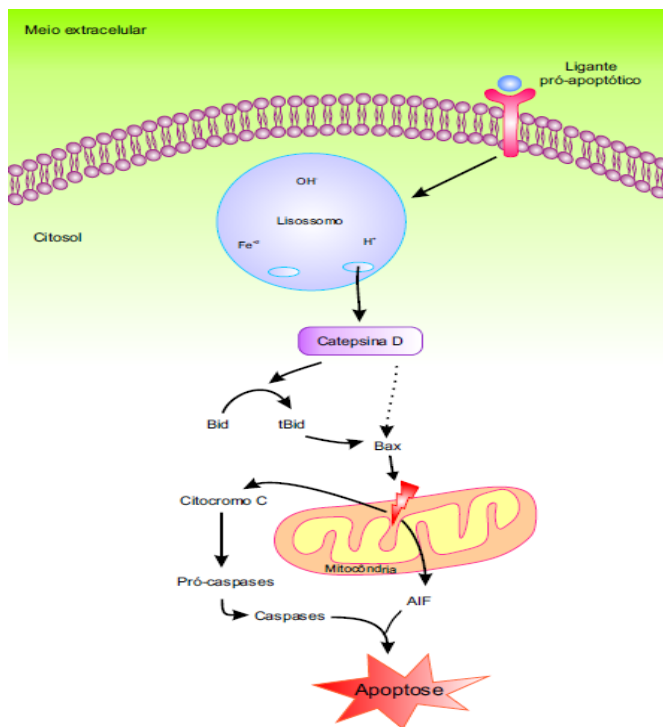


Figura 4 – Envolvimento da catepsina D na apoptose. Após a indução da apoptose, a abertura de poros na membrana lisossomal acarreta a liberação de catepsina D para o citosol. No citosol, a catepsina D ativa moléculas pró-apoptóticas Bid e Bax, que levam ao dano da membrana mitocondrial e consequente liberação de citocromo c para o citosol, onde atua como regulador da ativação de caspases, que levam à apoptose. Além disso, o dano à membrana da mitocôndria pode levar à liberação de AIF, e consequente apoptose independente de caspases. Abreviações: AIF - fator indutor de apoptose; Bax - proteína X associada a Bcl-2; Bid - agonista de morte do domínio de interação BH3; tBid - agonista de morte do domínio de interação BH3 truncado. Fonte: modificado de Chwieralski et al., 2006.

1.2.1.1.3 Inibidor do ativador de plasminogênio-1

O inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1) é uma glicoproteína pertencente à superfamília das serpinas, que representam cerca de 10 % do total de proteínas no plasma humano. Periféricamente, a proteína PAI-1 possui ação fundamental no sistema fibrinolítico, através da regulação da plasmina, molécula que dissolve a rede de

fibrina envolvida na formação de trombos sanguíneos (Rijken e Lijnen, 2009). Sendo secretado por diversos tipos celulares na sua forma ativa, PAI-1 inibe os ativadores de plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) e do tipo uricínase, que são responsáveis pela ativação de plasminogênio a plasmina (Ho-Tin-Noé et al., 2009; Schonfeld-Dado e Segal, 2011; Van De Craen et al., 2012). Por sua vez, a plasmina exerce papel fundamental em processos de ativação de moléculas envolvidas na clivagem de pró-BDNF em BDNF maduro (Pang et al., 2004) (Figura 5) e na ativação de metaloproteinases de matriz (MMPs) no SNC (Murphy e Docherty, 1992; Opendakker e Van Damme, 1992).

Estudos anteriores demonstraram o papel de PAI-1 em doenças neuroinflamatórias, como a esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica e encefalomielite alérgica (Cuzner et al., 1996; Gveric et al., 2003; East et al., 2005; Ngo et al., 2015), em que a alteração nos níveis de PAI-1 contribuem para o prejuízo na capacidade fibrinolítica, formação de complexos t-PA/PAI-1 e desregulação da ação de MMPs, que podem contribuir para a quebra da BHE e da bainha de mielina, levando ao dano axonal nestas doenças.

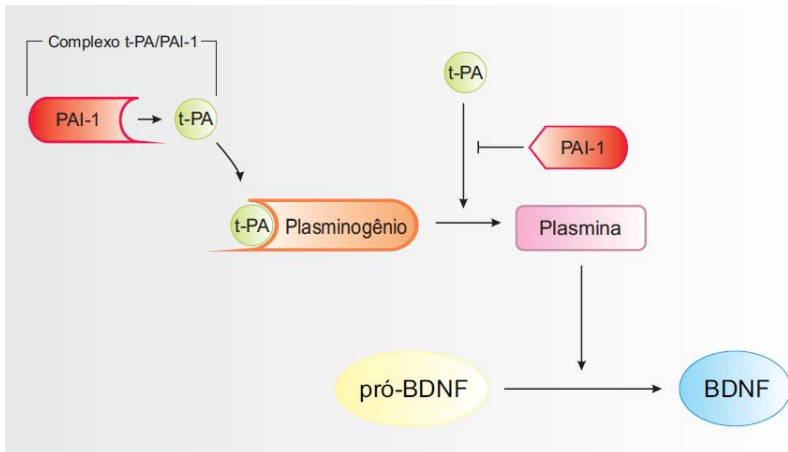


Figura 5 – Mecanismo indireto de regulação de BDNF via PAI-1. PAI-1 atua como inibidor da ação de t-PA, molécula que ativa plasminogênio em plasmina. A plasmina, por sua vez, é a protease mais importante envolvida no processo de clivagem de pró-BDNF em BDNF maduro. Abreviações: BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro; PAI-1 - inibidor do ativador de plasminogênio-1; t-PA - ativador de plasminogênio do tipo tecidual. Fonte: autora.

1.2.1.1.4 Fatores de crescimento derivados de plaquetas

A família dos fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) compreende cinco fatores organizados em homo e heterodímeros: PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC e PDGF-DD (Andrae et al., 2008). Cada isoforma se liga a um dos receptores tirosina cinase de PDGF, classificados como do tipo alfa (PDGFR- α) e do tipo beta (PDGFR- β) (Fredriksson et al., 2004). Os PDGF são importantes mitógenos, estimulando crescimento, diferenciação e quimiotaxia de células, exercendo função essencial durante a embriogênese e auxiliando no desenvolvimento de diversos tecidos (Heldin e Westermark, 1999). Além disso, são essenciais na indução da diferenciação e proliferação de células progenitoras de oligodendrócitos (OPC) (Skoff e Benjamins, 2014). Atuando em receptores PDGFR $\alpha\alpha$ (único tipo de receptor para PDGF expresso em OPC), os PDGF-AA, -AB e -BB induzem uma cascata de sinalização que culmina na produção do fator de transcrição da linhagem de oligodendrócitos-2 (Olig2) (Figura 6) (Baron et al., 2000; Hu et al., 2008), que promove a diferenciação de OPC em oligodendrócitos.

Para o correto funcionamento cerebral, nem todas as OPC devem se diferenciar em oligodendrócitos durante o período de desenvolvimento (Miller et al., 2002). Fisiologicamente, o SNC adulto contém um número significativo de OPC que possuem capacidade proliferativa (Wolswijk e Noble, 1989; Wolswijk et al., 1991). A partir de estímulos gerados durante situações patológicas desmielinizantes, estas células podem dar origem a novos oligodendrócitos para auxiliar no reparo e remielinização de áreas cerebrais prejudicadas (Levine et al., 2001; Reynolds et al., 2001). Por isso, além de exercer funções essenciais durante a embriogênese, os PDGF também possuem importante função no SNC adulto.

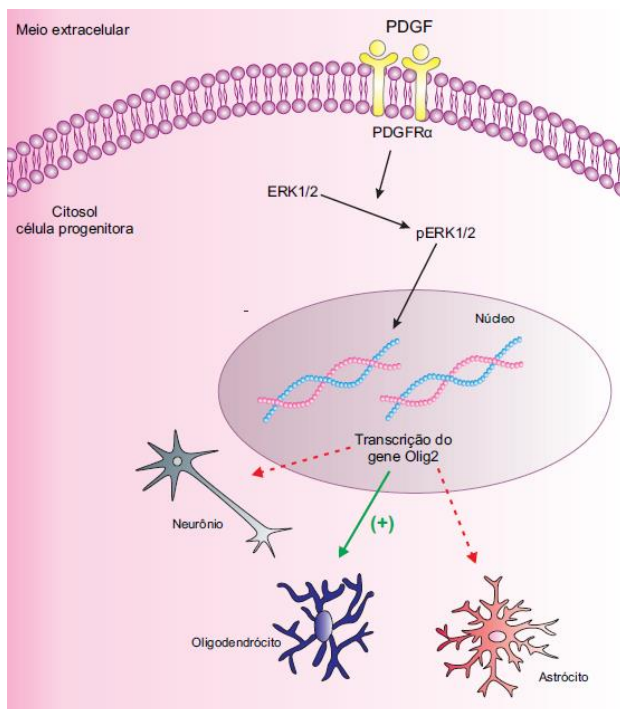


Figura 6 – Indução da diferenciação de OPC em oligodendrócito via PDGF. Ao se ligar em seu receptor específico na membrana celular de células progenitoras, o PDGF induz a ativação de uma cascata de sinalização que culmina na transcrição do gene Olig2, levando estas células a se diferenciarem em oligodendrócitos. Abreviações: ERK - cinase reguladora de sinal extracelular; Olig2 - fator de transcrição da linhagem de oligodendrócitos 2; PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas; PDGFR α - receptor tirosina cinase de PDGF do tipo alfa; pERK - cinase reguladora de sinal extracelular fosforilada. Fonte: modificado de Hu et al., 2008.

1.2.1.2 Moléculas envolvidas na neuroinflamação

1.2.1.2.1 Mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO; EC 1.11.2.2) é uma hemoproteína secretada primeiramente por neutrófilos (Schultz e Kaminker, 1962). Entretanto, pode também ser encontrada em monócitos (Nichols e Bainton, 1973), macrófagos, microglia (Yap et al., 2007; Lefkowitz e Lefkowitz, 2008), astrócitos (Maki et al., 2009) e neurônios (Ray e

Katyal, 2016). A partir da produção de ácido hipocloroso (HOCl), a MPO exerce papel fundamental na indução da morte de agentes microbianos e na regulação do estresse oxidativo durante o processo inflamatório e doenças neurodegenerativas (Hampton et al., 1998; Klebanoff, 2005).

Nesse sentido, o estresse agudo ou crônico ao SNC induz a produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) através de múltiplos mecanismos, incluindo a cadeia transportadora de elétrons, fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) oxidase e xantina oxidase (Brand et al., 2004; Galbusera et al., 2006; Brennan et al., 2009). O $O_2^{\cdot-}$ produzido primeiramente pela microglia é dismutado a um produto menos tóxico, o H_2O_2 , através da ação da enzima SOD. O H_2O_2 então liberado reage com os íons cloreto na presença da MPO, formando HOCl, molécula 50 vezes mais potente do que o H_2O_2 na eliminação de patógenos (Winterbourn e Kettle, 2004). Alternativamente, a microglia ativada estimula a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) a produzir óxido nítrico (NO), que dá origem às ER peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) e cloreto de nitrila (NO_2Cl), exacerbando o dano tecidual ao SNC (Ono et al., 2010). Na presença de NO, a MPO ainda pode produzir radical nitrito (NO_2^{\cdot}), resultando em estresse nitrosativo. A exacerbação da produção de HOCl e de ER de nitrogênio contribui para os danos oxidativos ao SNC como lipoperoxidação, nitração e oxidação de proteínas, dano oxidativo ao DNA e ativação de MMPs, levando à neurodegeneração (Ray e Katyal, 2016) (Figura 7). De fato, estudos anteriores já descreveram o envolvimento da MPO na fisiopatologia de doenças de cunho neurológico, como esclerose múltipla, doenças de Alzheimer e Parkinson e depressão (Nagra et al., 1997; Green et al., 2004; Gray et al., 2008; Vaccarino et al., 2008; Everse e Coates, 2009; Gałecky et al., 2012; Teismann, 2014; Jucaite et al., 2015).

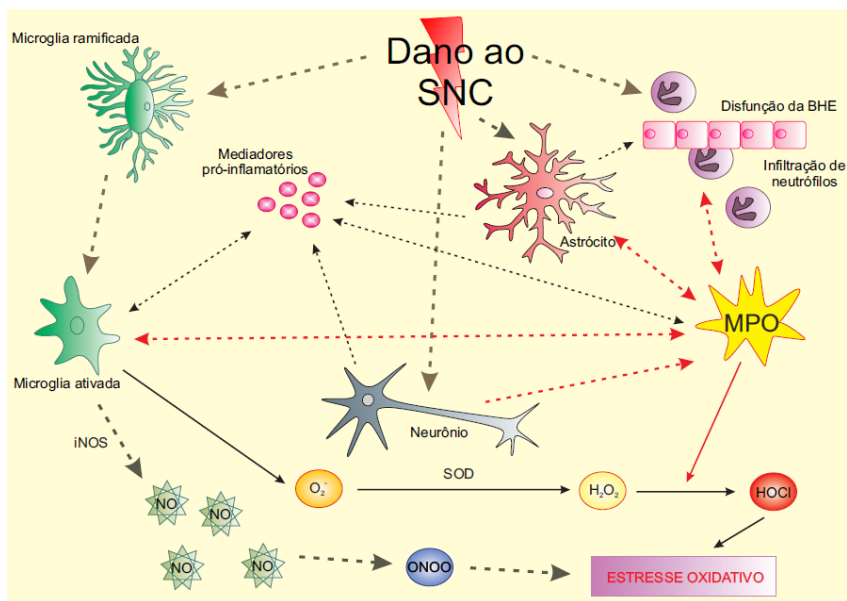


Figura 7 – Papel da mieloperoxidase no estresse oxidativo que pode levar à neurodegeneração. Durante o processo de dano ao SNC, a ativação de células gliais residentes (microglia e astrócitos) e a disfunção da BHE levam ao aumento da produção de MPO no tecido cerebral, exacerbando o estresse oxidativo que pode levar à neurodegeneração. Abreviações: BHE - barreira hematoencefálica; iNOS - óxido nítrico sintase induzível; MPO - mieloperoxidase; NO - óxido nítrico; SNC - sistema nervoso central; SOD - superóxido dismutase. Fonte: modificado de Ray e Katyal, 2016.

1.2.1.2.2 Quimiocina regulada sob a ativação e secreção de células T

A quimiocina regulada sob ativação e secreção de células T (RANTES), também conhecida como ligante CC-5 (CCL5), é uma pequena proteína composta por 68 aminoácidos e pertence à família de quimiocinas do tipo CC (Zlotnik e Yoshie, 2000). Foi primeiramente identificada quando pesquisadores procuravam genes expressos por linfócitos T humanos em um estágio tardio de inflamação (3-5 dias após a ativação de receptores para células T) (Schall et al., 1988). Sendo secretada principalmente por células T, RANTES também pode ser produzida por outros tipos celulares, como plaquetas, macrófagos, eosinófilos e fibroblastos (Appay e Rowland-Jones, 2001). Durante o processo inflamatório, a RANTES induz a migração de leucócitos para sítios inflamatórios através de sua ligação com receptores (chamados

CCR1, CCR3, CCR4 e CCR5) presentes na membrana de diversas células, como linfócitos T, monócitos, basófilos, eosinófilos, células *natural killer*, células dendríticas e mastócitos (Schall, 1991) (Figura 8).

O aumento de expressão de RANTES e de seus receptores em astrócitos, na microglia e em células epiteliais do SNC (van der Meer et al., 2000; Flynn et al., 2003) vem sendo implicado em várias doenças neurológicas, como as doenças de Alzheimer e Parkinson (Xia et al., 1998; Johnstone et al., 1999; Cartier et al., 2005) e esclerose múltipla (Sørensen et al., 1999; Simpson et al., 2000), e em erros inatos do metabolismo (Sun et al., 2005; Holven et al., 2006).

1.2.1.2.3 Moléculas de adesão celular

Durante a inflamação, os leucócitos circulantes no sangue interagem com o epitélio vascular e penetram em sítios inflamatórios teciduais, onde então podem exercer sua função de eliminar agentes agressores (Libby, 2007). Assim, as moléculas de adesão celular (CAM) são responsáveis pela mediação da comunicação entre leucócitos e células epiteliais (Horstkorte e Fuss, 2012). No SNC, as células epiteliais do tecido cerebral expressam as moléculas de adesão celular intracelular (ICAM-1) e vascular (VCAM-1), que se ligam a proteínas específicas presentes na superfície de leucócitos e favorecem a diapedese dessas células para locais de inflamação (Figura 8) (Wilson et al., 2010). Citocinas liberadas durante a inflamação, tais como IFN- γ , TNF- α e IL-1 β , estimulam a produção das CAM (Meager, 1999).

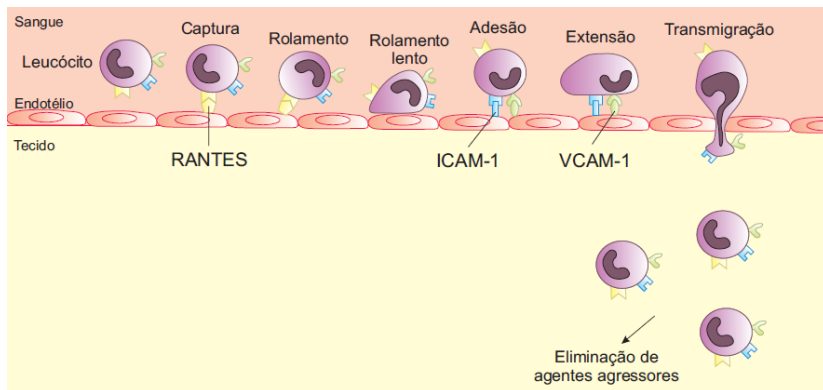


Figura 8 – Migração de leucócitos do meio vascular para o sítio de inflamação mediada ICAM-1, VCAM-1 e RANTES. Durante a inflamação, a diapedese de leucócitos do sangue para o tecido é mediada por quimiocinas e moléculas de adesão. RANTES, ICAM-1 VCAM-1 interagem com receptores específicos presentes em leucócitos, auxiliando na sua captura e adesão em células endoteliais e posterior transmigração. Abreviações: ICAM-1 - molécula de adesão celular intracelular-1; VCAM-1 - molécula de adesão celular vascular-1; RANTES - quimiocina regulada sob ativação e secreção de células T. Fonte: autora.

No cérebro, as CAM também contribuem para a regulação da plasticidade celular, da sobrevivência neuronal e a manutenção da integridade da BHE (Rutishauser et al., 1988; Rønn et al., 2000; Kiss e Muller, 2001; Armentero et al., 2011). Neste cenário, a molécula de adesão celular neuronal (NCAM) desenvolve papel fundamental na adesão célula-célula, auxiliando no crescimento de neuritos, na plasticidade sináptica, no desenvolvimento neuronal e na neurogênese (Figura 9) (Persohn e Schachner, 1987; Rønn et al., 2000; Amoureux et al., 2001; Kiss e Muller, 2001; Schuster et al., 2001). Estudos prévios relataram o papel dessas moléculas em patologias neuroinflamatórias crônicas, como nas doenças de Alzheimer e Parkinson e na esclerose lateral amiotrófica (Akiyama et al., 1993; Verbeek et al., 1994; Rentzos et al., 2005; Miklossy et al., 2006; Xu et al., 2010).

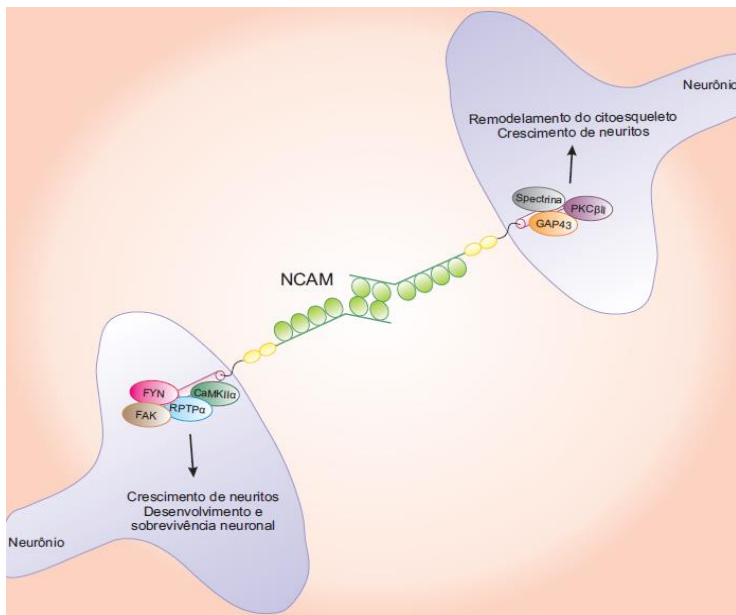


Figura 9 – Adesão e sinalização celular mediada por NCAM em neurônios. A adesão celular mediada por NCAM induz a ativação de CAMKII α , que então ativa RPTP α e promove a ativação de FYN, resultando na estimulação de FAK e crescimento e sobrevivência neuronal. As interações homofílicas de NCAM também estimulam o recrutamento de GAP43, resultando na formação do complexo spectrina-GAP43- PKC β II, que promove remodelamento do citoesqueleto e crescimento de neuritos. Abreviações: CAMKII α - proteína cinase II alfa dependente de calmodulina; FAK - cinase de adesão focal; FYN - proteína tirosina cinase Fyn; GAP43 - proteína associada ao crescimento-43; NCAM - molécula de adesão celular neuronal; PKC β II - proteína cinase C beta-2; RPTP α - proteína tirosina fosfatase- α do tipo receptor. Fonte: modificado de Cavallaro e Dejana, 2011.

1.3 JUSTIFICATIVA

Considerando-se que altas concentrações de Phe podem induzir efeitos deletérios à célula em modelos animais de HPA, e que estudos sobre os mecanismos do dano cerebral presente na PKU são escassos, torna-se importante a investigação de sua fisiopatologia, na tentativa de colaborar para o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os níveis plasmáticos de marcadores de neurodegeneração em pacientes fenilcetonúricos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os níveis de BDNF e PAI-1 total em amostras de plasma de pacientes fenilcetonúricos e de indivíduos saudáveis;
- Investigar os níveis de catepsina D em amostras de plasma de pacientes fenilcetonúricos e de indivíduos saudáveis;
- Investigar os níveis de PDGF-AA e PDGF-AB/BB em amostras de plasma de pacientes fenilcetonúricos e de indivíduos saudáveis;
- Investigar os níveis de MPO em amostras de plasma de pacientes fenilcetonúricos e de indivíduos saudáveis;
- Investigar os níveis de RANTES em amostras de plasma de pacientes fenilcetonúricos e de indivíduos saudáveis;
- Investigar os níveis das moléculas de adesão celular NCAM, VCAM-1 e ICAM-1 em plasma de pacientes fenilcetonúricos e de indivíduos saudáveis.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

O presente trabalho é um estudo de caso-controle com abordagem quantitativa.

3.2 AMOSTRAS

Para a realização deste estudo, foram utilizadas amostras de plasma de pacientes com diagnóstico de PKU (n=24) obtidas do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Todos os pacientes foram submetidos ao tratamento dietético através da restrição da ingestão de Phe e suplementação de fórmula rica em aminoácidos, que é realizada individualmente de acordo com as necessidades nutricionais, estágio do crescimento e tolerância à Phe que cada um apresenta. Características como idade de diagnóstico, tipo de PKU e presença de sintomas como microcefalia, déficit no desenvolvimento neuropsicomotor, distúrbio comportamental e convulsão foram obtidas dos prontuários destes pacientes. Não houve critério de exclusão de amostras, visto que a PKU é uma doença rara e a obtenção de amostras de pacientes acometidos por esta doença é difícil.

Amostras de plasma também foram coletadas de indivíduos saudáveis (n=14; grupo controle) pareados por idade (controle: $15,8 \pm 5,32$ anos; PKU: $15,8 \pm 4,5$ anos) e gênero, provenientes de laboratórios de análises clínicas comerciais do município de Criciúma (Santa Catarina). Foram selecionadas amostras de indivíduos que não possuíam diagnóstico de erros inatos do metabolismo ou de qualquer outra enfermidade que pudesse se tornar um viés para o estudo.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Extremo Sul Catarinense sob protocolo nº 529.013 (ANEXO A).

3.2.1 Preparo das amostras

O sangue periférico de indivíduos controle e de pacientes fenilcetonúricos foi coletado em tubos de coleta contendo heparina como anticoagulante. Após a coleta, o sangue total foi centrifugado a

1000 x g para obtenção do plasma, que foi aspirado e congelado a -80 °C até o momento das análises.

3.2.2 Medida dos níveis plasmáticos de Phe

A determinação dos níveis plasmáticos de Phe em amostras de pacientes e de indivíduos controle foi realizada por HPLC de acordo com Joseph e Marsden (1986). A quantificação foi realizada através da relação entre a área cromatográfica do pico de Phe obtida de uma solução desconhecida com a área do pico de um padrão interno (ácido homocisteico) com concentração conhecida. Os resultados estão expressos em mg de Phe/dL de plasma.

3.3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE NEURODEGENERAÇÃO

Os níveis plasmáticos de BDNF, catepsina D, MPO, NCAM, PAI-1 total, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, RANTES, ICAM-1 e VCAM-1 foram dosados através de kit comercial Milliplex® (HNDG3MAG-36K, Millipore, Darmstadt, Alemanha), obedecendo-se as especificações do fornecedor. Os ensaios fundamentaram-se na metodologia de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) “sanduíche” convencional de dois sítios, em que uma mistura de microesferas foi incubada com padrões e amostras em placa de 96 poços. Posteriormente, o anticorpo de detecção biotilnilado específico foi adicionado. O resultado final foi amplificado por uma incubação com o conjugado estreptavidina/ficoeritina. As microesferas foram lidas em equipamento Luminex® xMAP® (Luminex, Austin, EUA) através de um sistema duplo de lasers que incidiu sobre as microesferas, à medida que estas fluíam através do fluxo celular. Um feixe de laser, então, detectou a microesfera e o outro laser quantificou o sinal em cada microesfera. Os resultados estão expressos em pg/mL de plasma e ng/mL de plasma.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados do presente estudo estão apresentados como média \pm desvio padrão da média. Para a comparação entre as médias, os dados obtidos na determinação dos marcadores de neurodegeneração foram analisados pelo teste *t* de Student para amostras independentes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico

IBM SPSS Statistics (IBM, Armonk, Estados Unidos) e foram consideradas diferenças significativas quando o valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Para a realização deste estudo, foram utilizadas amostras de plasma de pacientes diagnosticados com PKU e de indivíduos saudáveis. As características dos pacientes incluídos neste trabalho estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 – Características dos pacientes incluídos neste estudo.

Indivíduo	Sexo	Phe (mg/dl)	Idade (anos)	MCF	RDNPM	DC	CV	Tipo de PKU	Idade de diagnóstico (dias)
PKU 1	F	23,3	15	Não	Sim	Não	Não	Clássica	30
PKU 2	F	3,4	13	Não	Não	Não	Não	Leve	30
PKU 3	F	11	13	Não	Sim	Não	Não	Clássica	30
PKU 4	M	8,3	13	Não	Não	Não	Não	Leve	180
PKU 5	F	17,6	16	Não	Não	Não	Não	Clássica	60
PKU 6	M	20,6	27	Não	Não	Não	Não	Clássica	60
PKU 7	F	11	17	Não	Não	Não	Não	Clássica	60
PKU 8	M	13,1	18	Sim	Sim	Sim	Não	Clássica	60
PKU 9	M	12	14	Não	Não	Não	Não	Leve	31
PKU 10	F	5,5	19	Não	Não	Não	Não	Leve	90
PKU 11	M	4,7	24	Não	Não	Não	Não	Leve	50
PKU 12	F	13,1	13	Não	Não	Não	Não	Clássica	26
PKU 13	F	15,1	14	Não	Não	Não	Não	Leve	60
PKU 14	M	7,8	14	Não	Não	Não	Não	Leve	60
PKU 15	M	10,4	16	Não	Sim	Sim	Não	Clássica	36
PKU 16	M	6,5	14	Não	Não	Não	Não	Leve	90
PKU 17	F	15,4	18	Não	Não	Não	Não	Clássica	30
PKU 18	F	14,5	24	Não	Não	Não	Não	Leve	810
PKU 19	F	13	13	Sim	Não	Não	Não	Clássica	60
PKU 20	M	ND	9	Não	Não	Não	Não	Clássica	90
PKU 21	F	11,2	16	Não	Não	Não	Não	Leve	60
PKU 22	M	5,8	14	Não	Não	Não	Não	Leve	64
PKU 23	M	15,8	18	Não	Não	Não	Não	Clássica	28
PKU 24	M	9,3	7	Não	Não	Não	Não	Leve	120
Ctrl 1	F	ND	23	-	-	-	-	-	-
Ctrl 2	M	ND	13	-	-	-	-	-	-
Ctrl 3	M	ND	13	-	-	-	-	-	-
Ctrl 4	F	ND	18	-	-	-	-	-	-
Ctrl 5	F	ND	13	-	-	-	-	-	-
Ctrl 6	F	ND	18	-	-	-	-	-	-
Ctrl 7	M	ND	26	-	-	-	-	-	-

Ctrl 8	M	ND	23	-	-	-	-	-	-
Ctrl 9	F	ND	17	-	-	-	-	-	-
Ctrl 10	F	2,8	7	-	-	-	-	-	-
Ctrl 11	M	2,3	11	-	-	-	-	-	-
Ctrl 12	M	2,1	14	-	-	-	-	-	-
Ctrl 13	M	1,6	12	-	-	-	-	-	-
Ctrl 14	F	2,2	13	-	-	-	-	-	-

Ctrl - controle; CV - convulsões; DC - distúrbio comportamental; MCF - microcefalia; ND - não determinado; Phe - fenilalanina; PKU - fenilcetonúria; RDNPM - retardo no desenvolvimento neuropsicomotor.

Inicialmente, foram avaliados os níveis de Phe no plasma de indivíduos saudáveis e dos pacientes fenilcetonúricos (grupo PKU). Os indivíduos do grupo PKU apresentaram valores plasmáticos de Phe elevados quando comparados ao grupo controle (Figura 10).

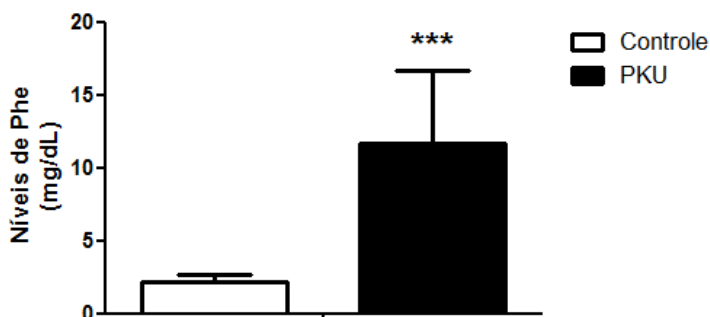


Figura 10 - Níveis de fenilalanina (Phe) em plasma de indivíduos controle e pacientes fenilcetonúricos (grupo PKU). Os valores representam média \pm desvio padrão da média e estão expressos em miligrama por decilitro. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle (teste t de Student para amostras independentes).

Posteriormente, foram avaliados os níveis de marcadores de neurodegeneração em plasma de indivíduos saudáveis e de pacientes fenilcetonúricos. Nos pacientes com PKU, os níveis plasmáticos de BDNF (Figura 11), PDGF-AA (Figura 12) e PDGF-AB/BB (Figura 13) encontraram-se significativamente diminuídos quando comparados ao grupo controle.

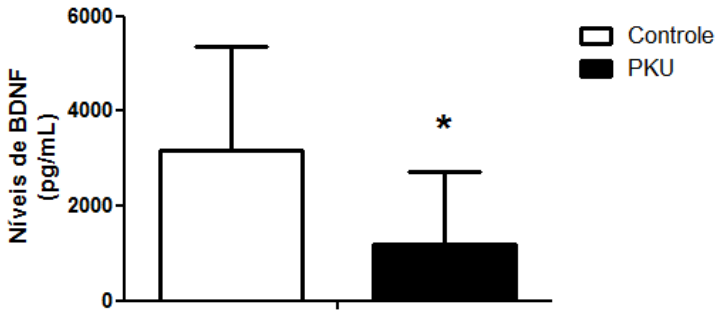


Figura 11 - Níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em plasma de indivíduos controle e pacientes fenilcetonúricos (grupo PKU). Os valores representam média \pm desvio padrão da média e estão expressos em picograma por mililitro. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste t de Student para amostras independentes).

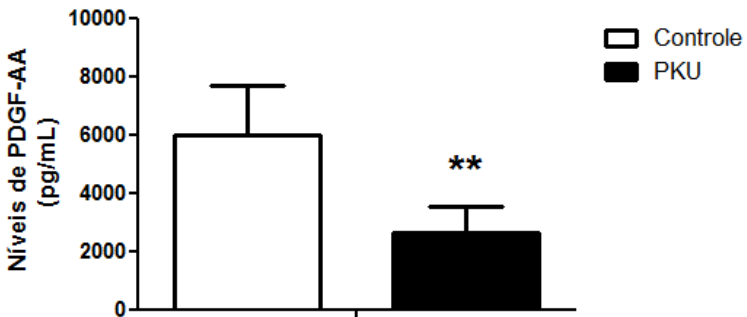


Figura 12 - Níveis de fator de crescimento derivado de plaquetas-AA (PDGF-AA) em plasma de indivíduos controle e pacientes fenilcetonúricos (grupo PKU). Os valores representam média \pm desvio padrão da média e estão expressos em picograma por mililitro. * $p < 0,01$ comparado ao grupo controle (teste t de Student para amostras independentes).

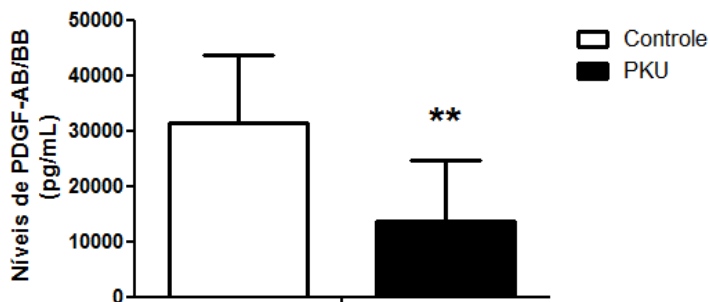


Figura 13 - Níveis de fator de crescimento derivado de plaquetas-AB/BB (PDGF-AB/BB) em plasma de indivíduos controle e pacientes fenilcetonúricos (grupo PKU). Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em picograma por mililitro. * $p < 0,01$ comparado ao grupo controle (teste t de Student para amostras independentes).

Os níveis plasmáticos de ICAM-1, catepsina D, MPO, RANTES, NCAM, VCAM-1 e PAI-1 não foram significativamente diferentes entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2 – Níveis de ICAM-1, catepsina D, MPO, RANTES, NCAM, VCAM-1 e PAI-1 em plasma de indivíduos controle e pacientes fenilcetonúricos. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Parâmetro (ng/mL)	Grupo	Média ± Desvio Padrão	Valor de <i>p</i>
ICAM-1	Controle	260,56 ± 106,67	0,835
	PKU	243,29 ± 174,85	
Catepsina D	Controle	222,46 ± 132,24	0,281
	PKU	148,52 ± 34,585	
MPO	Controle	2198,24 ± 2093,71	0,156
	PKU	562,63 ± 521,65	
RANTES	Controle	56,37 ± 37,35	0,376
	PKU	44,12 ± 25,40	
NCAM	Controle	336,39 ± 60,53	0,462
	PKU	363,70 ± 76,29	
VCAM-1	Controle	826,39 ± 136,23	0,692
	PKU	793,64 ± 170,71	
PAI-1	Controle	170,67 ± 77,35	0,063
	PKU	83,04 ± 32,71	

ICAM-1 - molécula de adesão celular intracelular 1; MPO - mieloperoxidase; NCAM - molécula de adesão celular neuronal; PAI-1 - inibidor do ativador de plasminogênio tecidual; PKU - fenilcetonúria; RANTES - quimiocina regulada sob ativação e secreção de células T; VCAM-1 - molécula de adesão celular vascular 1.

5 DISCUSSÃO

Até o presente momento, a principal alternativa terapêutica para o tratamento das manifestações clínicas da PKU consiste de dieta restrita em Phe e suplementação de fórmula especial que contém aminoácidos, vitaminas e minerais (Feillet e Agostoni, 2010; Poustie e Wildgoose, 2010; Casey, 2013). A implementação precoce do tratamento pode auxiliar na prevenção do dano cerebral e, em alguns casos, permite uma vida normal ao paciente. Porém, o agravamento de sintomas neuropsicológicos pode acontecer, principalmente devido à não adesão ao tratamento (MacLeod e Ney, 2010; MacDonald et al., 2012). Todos os indivíduos acometidos por PKU incluídos neste trabalho recebem tratamento nutricional. A concentração plasmática de Phe nestes pacientes permanece alta quando comparados aos indivíduos controle.

Até o momento, a fisiopatologia do dano cerebral encontrado nos pacientes fenilcetonúricos não está completamente estabelecida. Portanto, neste trabalho foi observado que os níveis de BDNF, PDGF-AA e PDGF-AB/BB encontram-se diminuídos no plasma de pacientes com PKU quando comparados a indivíduos controle.

Considerando-se que o BDNF é essencial para a sobrevivência e manutenção neuronal, o envolvimento desta neurotrofina na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas, bem como o seu possível efeito terapêutico no tratamento destas doenças, vem sendo investigado (Zuccato e Cattaneo, 2009; Allen et al., 2013). O BDNF e seu receptor TrkB exercem papel fundamental no desenvolvimento e plasticidade cerebral (Huang e Reichardt, 2001; Poo, 2001), contribuindo para a sinaptogênese, plasticidade sináptica, funções cognitivas e processos de memória (Chen et al., 1999; Minichiello et al., 1999; Alsina et al., 2001, Lee et al., 2004, Lu et al., 2014). Assim como ocorre na secreção de outras neurotrofinas, a produção de BDNF se dá a partir de uma molécula precursora, o pró-BDNF, que dá origem à proteína madura através de clivagem proteolítica (Tsai, 2007). PAI-1, marcador avaliado neste trabalho, atua na modulação indireta dos níveis de BDNF através da inibição que exerce sobre o t-PA, molécula responsável pela ativação de plasminogênio em plasmina (Ho-Tin-Noé et al., 2009; Schonfeld-Dado e Segal, 2011). A plasmina, por sua vez, é a protease mais importante envolvida no processo de clivagem de pró-BDNF em BDNF maduro (Lee et al., 2001; Pang et al., 2004). Neste estudo, os níveis plasmáticos de PAI-1, apesar de demonstrarem tendência de diminuição, não foram significativamente diferentes entre os pacientes com PKU e os indivíduos controle, demonstrando que, provavelmente, a diminuição

dos níveis de BDNF no plasma de pacientes fenilcetonúricos não se deve à alteração na clivagem de pró-BDNF em BDNF pela plasmina.

Neste sentido, Li et al. (2010) demonstraram uma diminuição da expressão e do conteúdo de BDNF em neurônios expostos a altas concentrações de Phe. Além disso, as altas concentrações de Phe ativam a via de sinalização RhoA/Rho associada a cinases em neurônios corticais, levando-os à apoptose (Zhang et al., 2007). Esse efeito foi revertido pelo pré-tratamento destes neurônios com BDNF (Zhang et al., 2010), demonstrando um potencial efeito neuroprotetor desta neurotrofina. Esses resultados corroboram os achados deste trabalho, indicando que a diminuição dos níveis de BDNF pode contribuir para o dano neurológico encontrado em pacientes com PKU.

No sangue, o BDNF é armazenado nas plaquetas (Yamamoto e Gurney, 1990). As plaquetas se ligam, armazenam e liberam BDNF em determinadas situações, como para facilitar o reparo de neurônios periféricos ou de outros tecidos que expressam o receptor TrkB quando expostos à algum tipo de trauma (Fujimura et al., 2002). Neste contexto, o BDNF armazenado nas plaquetas pode ser derivado de células cerebrais, como neurônios e glia, visto que essa neurotrofina atravessa livremente a BHE (Pan et al., 1998). Em adição, estudos pré-clínicos tem demonstrado que os níveis periféricos e cerebrais de BDNF foram correlacionados positivamente em diferentes espécies (Karege et al., 2002; Klein et al., 2011) e que a concentração sanguínea dessa neurotrofina pode vir a ser considerada um biomarcador de doenças psiquiátricas em humanos, como o transtorno bipolar e a depressão maior (Hashimoto, 2010; Fernandes et al., 2015; Nase et al., 2016). Sendo assim, acredita-se que os níveis de BDNF encontrados no plasma de indivíduos acometidos pela PKU possam estar relacionados àqueles encontrados no SNC desses pacientes.

Apesar de sua importante ação sobre neurônios ser largamente conhecida, o BDNF também possui papel fundamental na manutenção da oligodendroglia e na mielinização (Xiao et al., 2010; Ramos-Cejudo et al., 2015; Huang e Dreyfus, 2016). Estudos anteriores demonstraram que o BDNF se liga ao receptor TrkB expresso por OPC (Vondran et al., 2010; Wong et al., 2013), estimulando sua proliferação (Van't Veer et al., 2009) e potencializando sua diferenciação em oligodendrócitos maduros (Du et al., 2006a; Du et al., 2006b). Adicionalmente, Ramos-Cejudo et al. (2015) relataram o envolvimento do BDNF na remielinização de áreas afetadas por derrame isquêmico subcortical. Sendo assim, acredita-se que a diminuição dos níveis de BDNF em

pacientes fenilcetonúricos possa exacerbar a desmielinização característica da doença.

Nas OPC, os PDGF se ligam ao PDGFR- α e ativam uma cascata de sinalização que culmina na transcrição do gene *Olig2*, específico para oligodendrócitos (Bansal et al., 1996; Baron et al., 2000; Hu et al., 2008; Hu et al., 2012). Os oligodendrócitos são células altamente especializadas que contribuem para a propagação do impulso nervoso através da formação e manutenção da bainha de mielina que envolve os axônios (Nave e Werner, 2014). Vários autores demonstraram a importância dos PDGF na indução da mitose em OPC (Noble et al., 1988; Richardson et al., 1988; Pringle et al., 1989), auxiliando na sua sobrevivência (Barres et al., 1992; Barres et al., 1993) e regulando o momento da sua diferenciação em oligodendrócitos maduros (Raff et al., 1985; Raff et al., 1988; Hart et al., 1989; Butt et al., 1997).

Estudos anteriores investigaram os níveis de PDGF em sangue e líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com doenças neurodegenerativas, como as doenças de Parkinson e Alzheimer e a esclerose múltipla (Björkqvist et al., 2012; Harirchian et al., 2012; Mahlknecht et al., 2012; Mori et al., 2013). Visto que Harirchian et al. (2012) demonstraram uma forte correlação entre os níveis de PDGF em soro e LCR, acredita-se que as baixas concentrações de PDGF em plasma de pacientes fenilcetonúricos, assim como os baixos níveis encontrados neste trabalho, poderiam levar ao prejuízo na oligodendrogênese e contribuir para a desmielinização que estes pacientes apresentam.

Além de atuar na oligodendrogênese, o PDGF é um dos muitos fatores de crescimento que participam da regulação da expressão de PAI-1, apesar do mecanismo envolvido nesta modulação não estar completamente elucidado (Irigoyen et al., 1999). Nesse contexto, o baixo conteúdo plasmático de PDGF encontrado neste trabalho poderia estar relacionado à tendência de diminuição dos níveis de PAI-1 apresentada pelos pacientes fenilcetonúricos.

Neste estudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis plasmáticos das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 em pacientes com PKU e indivíduos controle. Estes resultados não corroboram estudos anteriores que demonstraram um aumento das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 em plasma de pacientes fenilcetonúricos (Schulpis et al., 2005b; Deon et al., 2015), visto que a secreção destas citocinas estimula a produção de CAM (Meager, 1999). Durante a inflamação, as células epiteliais aumentam a transcrição de

genes de ICAM-1 e VCAM-1 em resposta ao estímulo exercido pelas citocinas (Collins et al., 1995), e a via de sinalização do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) é crucial para esse processo (Mantovani et al., 1997; Hayden e Ghosh, 2011). Estudos anteriores demonstraram que, além de prejudicar a síntese proteica (van Spronsen et al., 2009; Gentile et al., 2010; Imperlini et al., 2014), a alta concentração de Phe alterou o imunocidade de NF- κ B em tecido cerebral de ratos expostos a um modelo quimicamente induzido de HPA (Macan, 2013), o que poderia impedir a síntese de CAM.

Estudos anteriores mostram que a NCAM exerce papel fundamental no bom funcionamento cerebral, não atuando somente na interação célula-célula, mas também na transdução de sinais através da membrana (Gnanapavan e Giovannoni, 2013), no crescimento de neuritos (Doherty e Walsh, 1992), na migração de neurônios (Akitaya e Bronner-Fraser, 1992), na mielinização (Palser et al., 2009) e na modulação de sinapses (Kiss e Muller, 2001). No presente estudo, os níveis plasmáticos de NCAM não foram alterados em amostras de pacientes com PKU quando comparados ao grupo controle. Além de interagir com outras NCAM nas células adjacentes, esta molécula de adesão atua em conjunto com outras moléculas, como, por exemplo, o BDNF e PDGF. Estudos demonstram que os níveis de NCAM interferem na homeostase do BDNF e modulam a resposta de neurônios a essa neurotrofina. Vutskits et al. (2001) observaram que a inativação de NCAM em neurônios corticais de camundongos levou à redução da diferenciação e à sobrevivência dessas células, e este efeito foi revertido com a adição de BDNF ao meio de cultura. Além disso, a fosforilação do receptor TrkB foi encontrada diminuída em hipocampo de animais que não expressavam NCAM, interferindo na sinalização do BDNF (Muller et al., 2000). Neste mesmo trabalho, os autores demonstraram que a adição de BDNF ao meio de cultura reverteu a deficiência na potenciação de longa duração (LTP) causada pela deficiência de NCAM. Adicionalmente, os níveis de BDNF e a fosforilação do seu receptor TrkB foram diminuídos em hipocampo e córtex frontal de animais nocaute para NCAM (Aonurm et al., 2015). Portanto, a diminuição dos níveis de BDNF encontrada no presente trabalho parece não estar relacionada com alteração da quantidade de NCAM.

Além de atuar em sinergia com o BDNF, a NCAM também interage com a ação do PDGF em OPC. Como dito anteriormente, a correta migração e diferenciação de OPC durante o desenvolvimento é essencial para a formação de oligodendrócitos e mielinização no SNC. As OPC são geradas na zona subventricular e então migram para

diversos locais no cérebro, onde recebem sinais intrínsecos e extrínsecos para dar início à sua diferenciação (Emery, 2010; Mitew et al., 2014). Grinspan e Franceschini (1995) demonstraram que pré-OPC que expressam NCAM se tornam oligodendrócitos maduros se tratadas com PDGF, apesar do mecanismo pelo qual ocorre esta interação não estar completamente elucidado. Neste mesmo trabalho, os autores observaram que as células que expressavam NCAM entravam em apoptose na ausência de PDGF, sugerindo, assim, que este fator de crescimento atua como modulador da sobrevivência de pré-OPC. Em adição, Armstrong et al. (2010) mostraram que as OPC migram em direção a um gradiente químico de PDGF *in vitro* através de quimiotaxia. A perda ou inativação de NCAM nessas células leva à alteração no padrão desta migração, demonstrando que essa molécula de adesão faz parte da maquinaria necessária para a correta detecção e resposta de OPC ao estímulo gerado pelo PDGF (Zhang et al., 2004). Visto que a concentração de NCAM não foi significativamente diferente no plasma de pacientes fenilcetonúricos quando comparados a indivíduos controle, a desmielinização apresentada por sujeitos acometidos por PKU não parece estar ligada com alterações nos níveis de NCAM.

O processo inflamatório cerebral contribui para os mecanismos fisiopatológicos de várias doenças neurodegenerativas (Lucas et al., 2006; Klegeris et al., 2007; Brown e Vilalta, 2015). A microglia, que representa as células imunes residentes do tecido cerebral, se encontra em estado não ativado durante situações fisiológicas e tem como função a produção de substâncias anti-inflamatórias e de caráter neurotrófico que colaboram para o bom funcionamento cerebral (Streit, 2002). Após a detecção de sinais de invasão de patógenos ou de dano tecidual, a microglia se torna ativada, promovendo uma resposta inflamatória que tem como objetivo exacerbar a resposta imune e iniciar o processo de reparo (Glass et al., 2010). Porém, a ativação crônica da microglia pode ocasionar dano a neurônios e a outras células gliais devido à exacerbação da liberação de substâncias citotóxicas (Perry, 2004).

Estudos prévios revelaram que células cerebrais expressam MPO em momento de estresse ao SNC (Gray et al., 2008; Lefkowitz e Lefkowitz, 2008), e que esse mecanismo pode estar envolvido na fisiopatologia do dano cerebral encontrado em doenças neurodegenerativas e desmielinizantes (Everse e Coates, 2009). Como demonstrado neste trabalho, o conteúdo plasmático de MPO não foi significativamente diferente entre pacientes fenilcetonúricos e indivíduos controle. Oh et al. (2005) demonstraram aumento na

expressão de MPO em cérebro de ratos nocaute para o gene PAH, possivelmente devido à ativação da microglia. Essa disparidade de resultados pode-se justificar pelos diferentes tipos de amostra utilizados em cada estudo e pelo fato de que todos os pacientes com PKU que participaram deste estudo receberam tratamento dietético, o que poderia amenizar o processo de inflamação cerebral.

Durante situações inflamatórias no SNC, a microglia ativada expressa catepsina D, uma protease aspártica lisossomal responsável pela regulação da degradação e ativação de moléculas envolvidas nos mais diversos processos bioquímicos (Kim et al., 2006; Benes et al., 2008). Kim et al. (2006) relacionaram a liberação de catepsina D pela microglia ativada com a morte de neurônios e de outras células gliais, demonstrando que a catepsina D exerce um importante papel na neurotoxicidade exercida pela ativação crônica da microglia. Como observado no presente estudo, não houve diferença significativa entre os níveis de catepsina D em plasma de indivíduos saudáveis e sujeitos acometidos por PKU. Este resultado condiz com um estudo prévio onde não foi observada alteração na atividade de catepsina D em cérebro de ratos submetidos a um modelo quimicamente induzido de HPA (Schröter et al., 1986). Portanto, alterações na homeostase da catepsina D não parecem estar envolvidas na fisiopatogenia do dano cerebral encontrado na PKU.

Outra molécula envolvida na neuroinflamação é a quimiocina RANTES, que, além de atrair células de defesa para sítios inflamatórios (Schall, 1991), também contribui para o correto desenvolvimento cerebral. Estudos prévios demonstraram que RANTES induziu a migração e diferenciação de neurônios primários sensoriais *in vitro* (Bolin et al., 1998) e a proliferação de progenitores astrocitários no período fetal em humanos (Bakhiet et al., 2001), promovendo sua expansão, sobrevivência e facilitando sua diferenciação. Porém, a alteração dos níveis cerebrais de RANTES vem sendo associada à progressão de doenças neurodegenerativas (Xia et al., 1998; Johnstone et al., 1999; Sørensen et al., 1999; Simpson et al., 2000; Cartier et al., 2005) e de erros inatos do metabolismo (Sun et al., 2005; Holven et al., 2006). No presente estudo, não houve diferença significativa nos níveis plasmáticos de RANTES em amostras de pacientes fenilcetonúricos quando comparados ao grupo controle. Este resultado demonstra que as alterações cognitivas encontradas em indivíduos acometidos pela PKU não estão relacionadas com alterações na concentração de RANTES.

Em resumo, o presente estudo descreveu alterações em parâmetros de neurodegeneração em plasma de pacientes com PKU. A

partir dos resultados obtidos, pode-se sugerir que a diminuição do conteúdo de moléculas importantes para o SNC possa estar envolvida na fisiopatologia do dano cerebral encontrado em pacientes afetados por esta doença (Figura 14). Apesar dos resultados obtidos neste trabalho não indicarem alteração na maioria dos marcadores avaliados, a relação destes parâmetros com os sintomas neurológicos apresentados por indivíduos fenilcetonúricos não pode ser descartada. A investigação de parâmetros neurodegenerativos pode ser de grande valor na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos que envolvem o prejuízo da função cerebral observado na PKU, e podem contribuir para o estabelecimento de novas condutas terapêuticas para o tratamento de pacientes afetados por essa doença.

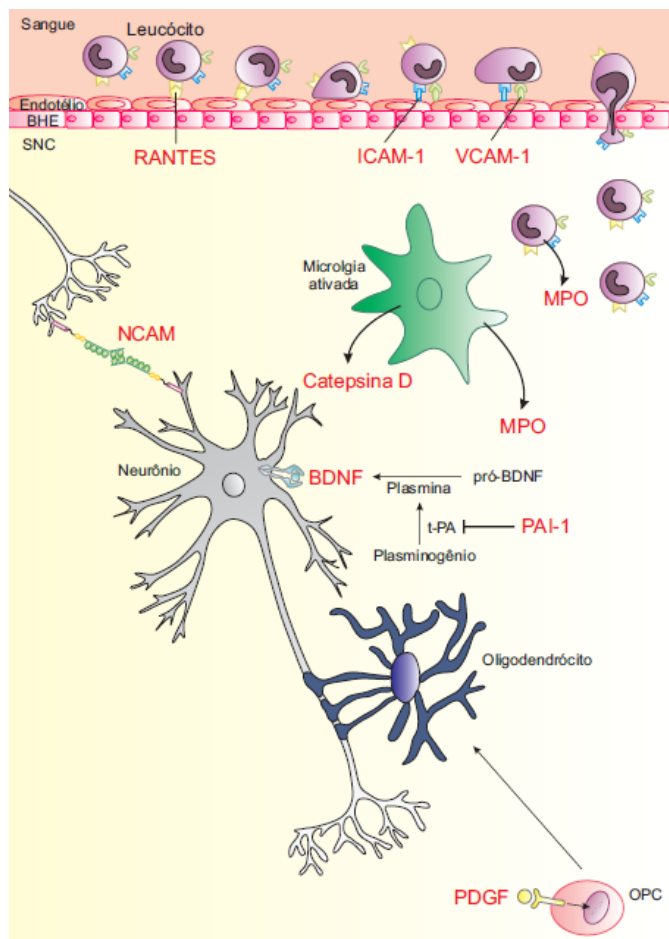


Figura 14 – Marcadores de neurodegeneração avaliados neste trabalho. No presente estudo, foi observado que pacientes fenilcetonúricos apresentam alterações nos níveis plasmáticos de BDNF e PDGF, envolvidos na sobrevivência e plasticidade neuronal e oligodendrogênese, respectivamente. BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro; BHE - barreira hematoencefálica; ICAM-1 - molécula de adesão celular intracelular-1; MPO - mieloperoxidase; OPC - célula precursora de oligodendrócito; PAI-1 - inibidor do ativador de plasminogênio-1; PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas; RANTES - quimiocina regulada sob ativação e secreção de células T; t-PA - ativador de plasminogênio do tipo tecidual; VCAM-1 - molécula de adesão celular vascular-1. Fonte: autora.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou a diminuição dos níveis plasmáticos de BDNF, PDGF-AA e PDGF-AB/BB em pacientes fenilcetonúricos, o que poderia colaborar para entendimento do dano neurológico apresentado por pacientes acometidos pela PKU.

REFERÊNCIAS

- Aisa B, Gil-Bea FJ, Solas M, García-Alloza M, Chen CP, Lai MK, Francis PT, Ramírez MJ. Altered NCAM expression associated with the cholinergic system in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(2):659-68.
- Akitaya T, Bronner-Fraser M. Expression of cell adhesion molecules during initiation and cessation of neural crest cell migration. *Dev Dyn.* 1992;194(1):12-20.
- Akiyama H, Kawamata T, Yamada T, Tooyama I, Ishii T, McGeer PL. Expression of intracellular adhesion molecule (ICAM)-1 by a subset of astrocytes in Alzheimer disease and some other degenerative neurological disorders. *Acta Neuropathol.* 1993;85(6):628-34.
- Alejandro MJ, Marco C, Ramirez H, Segovia JL, Garcia-Peregrin E. Lipid composition of brain myelin from normal and hyperphenylalaninemic chick embryos. *Comp Biochem Physiol B.* 1984;77(2):329-32.
- Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Patel NK. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther.* 2013;138(2):155-75.
- Alsina B, Vu T, Cohen-Cory S. Visualizing synapse formation in arborizing optic axons in vivo: dynamics and modulation by BDNF. *Nat Neurosci.* 2001;4(11):1093-101.
- Amor S, Puentes F, Baker D, van der Valk P. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology* 2010;129(2):154-69.
- Amoureux MC, Cunningham BA, Edelman GM, Crossin KL. N-CAM binding inhibits the proliferation of hippocampal progenitor cells and promotes their differentiation to a neuronal phenotype. *J. Neurosci.* 2001;20(10):3631-40.
- Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med.* 2004;10 Suppl:S18-25.
- Anderson PJ, Leuzzi V. White matter pathology in phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2010;99 Suppl 1:S3-9.
- Anderson PJ, Wood SJ, Francis DE, Coleman L, Anderson V, Boneh A. Are neuropsychological impairments in children with early-treated phenylketonuria (PKU) related to white matter abnormalities or elevated phenylalanine levels? *Dev Neuropsychol.* 2007;32(2):645-68.
- Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 2008;22(10):1276-312.

- Antisdel JE, Chrisler JC. Comparison of eating attitudes and behaviors among adolescent and young women with type 1 diabetes mellitus and phenylketonuria. *J Dev Behav Pediatr.* 2000;21(2):81-6.
- Antoshechkin AG, Chentsova TV, Tatur VYu, Naritsin DB, Railian GP. Content of phenylalanine, tyrosine and their metabolites in CSF in phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis.* 1991;14(5):749-54.
- Aonurm-Helm A, Anier K, Zharkovsky T, Castrén E, Rantamäki T, Stepanov V, Järv J, Zharkovsky A. NCAM-deficient mice show prominent abnormalities in serotonergic and BDNF systems in brain – Restoration by chronic amitriptyline. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2015;25(12):2394-403.
- Appay V, Rowland-Jones SL. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol.* 2001;22(2):83-7.
- Armentero MT, Levandis G, Bazzini E, Cerri S, Ghezzi C, Blandini F. Adhesion molecules as potential targets for neuroprotection in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2011;43(3):663-8.
- Armstrong RC, Harvath L, Dubois-Dalcq ME. Type 1 astrocytes and oligodendrocyte-type 2 astrocyte glial progenitors migrate toward distinct molecules. *J Neurosci Res.* 1990;27(3):400-7.
- Arnold GL, Kramer BM, Kirby RS, Plumeau PB, Blakely EM, Sanger Cregan LS, Davidson PW. Factors affecting cognitive, motor, behavioral and executive functioning in children with phenylketonuria. *Acta Paediatr.* 1998;87(5):565-70.
- Artuch R, Colomé C, Vilaseca MA, Sierra C, Cambra FJ, Lambruschini N, Campistol J. Plasma phenylalanine is associated with decreased serum ubiquinone-10 concentrations in phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis.* 2001;24(3):359-66.
- Artuch R, Vilaseca MA, Moreno J, Lambruschini N, Cambra FJ, Campistol J. Decreased serum ubiquinone-10 concentrations in phenylketonuria. *Am J Clin Nutr.* 1999;70(5):892-5.
- Authier F, Mort JS, Bell AW, Posner BI, Bergeron JJ. Proteolysis of glucagon within hepatic endosomes by membrane-associated cathepsins B and D. *J Biol Chem.* 1995;270(26):15798-807.
- Bakhiet M, Tjernlund A, Mousa A, Gad A, Strömblad S, Kuziel WA, Seiger A, Andersson J. RANTES promotes growth and survival of human first-trimester forebrain astrocytes. *Nat Cell Biol.* 2001;3(2):150-7.
- Bañkowska A, Gacko M, Chyczewska E, Worowska A. Biological and diagnostic role of cathepsin D. *Rocz Akad Med Białymst.* 1997;42 Suppl 1:79-85.

- Bansal R, Kumar M, Murray K, Morrison RS, Pfeiffer SE. Regulation of FGF receptors in the oligodendrocyte lineage. *Mol Cell Neurosci.* 1996;7(4):263-75.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1982;1(5):549-53.
- Baron W, Metz B, Bansal R, Hoekstra D, de Vries H. PDGF and FGF-2 signaling in oligodendrocyte progenitor cells: regulation of proliferation and differentiation by multiple intracellular signaling pathways. *Mol Cell Neurosci.* 2000;15(3):314-29.
- Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC. Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell.* 1992;70(1):31-46.
- Barres BA, Schmid R, Sendtner M, Raff MC. Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development.* 1993;118(1):283-95.
- Bedin M, Estrella CH, Ponzi D, Duarte DV, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM. Reduced Na(+),K(+)-ATPase activity in erythrocyte membranes from patients with phenylketonuria. *Pediatr Res.* 2001;50(1):56-60.
- Benes P, Vetvicka V, Fusek M. Cathepsin D – many functions of one aspartic protease. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008;68(1):12-28.
- Bidère N, Lorenzo HK, Carmona S, Laforge M, Harper F, Dumont C, Senik A. Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J Biol Chem.* 2003;278(33):31401-11.
- Bilder DA, Burton BK, Coon H, Leviton L, Ashworth J, Lundy BD, Vespa H, Bakian AV, Longo N. Psychiatric symptoms in adults with phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2013;108(3):155-60.
- Björkqvist M, Ohlsson M, Minthon L, Hansson O. Evaluation of a previously suggested plasma biomarker panel to identify Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2012;7(1):e29868.
- Blau N, Hennermann JB, Langenbeck U, Lichter-Konecki U. Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Mol Genet Metab.* 2011;104 Suppl:S2-9.
- Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet.* 2010;376(9750):1417-27.
- Blau N, Shen N, Carducci C. Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. *Expert Rev Mol Diagn.* 2014;14(6):655-71.

- Blau N. Genetics of Phenylketonuria: Then and Now. *Hum Mutat.* 2016;37(6):508-15.
- Bolin LM, Murray R, Lukacs NW, Strieter RM, Kunkel SL, Schall TJ, Bacon KB. Primary sensory neurons migrate in response to the chemokine RANTES. *J Neuroimmunol.* 1998;81(1-2):49-57.
- Bortoluzzi VT, de Franceschi ID, Rieger E, Wannmacher CM. 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. *Neurochem Res.* 2014;39(8):1594-602.
- Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(6):755-67.
- BRASIL. Portaria n. 822, de 6 de junho de 2001. Dispõe sobre o Programa Nacional de Triagem Neonatal/PNTN.
- Bredesen DE, Rao RV, Mehlen P. Cell death in the nervous system. *Nature.* 2006;443(7113):796-802.
- Brennan AM, Suh SW, Won SJ, Narasimhan P, Kauppinen TM, Lee H, Edling Y, Chan PH, Swanson RA. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat Neurosci.* 2009;12(7):857-63.
- Brown GC, Vilalta A. How microglia kill neurons. *Brain Res.* 2015;1628(Pt B):288-97.
- Burgard P, Armbruster M, Schmidt E, Rupp A. Psychopathology of patients treated early for phenylketonuria: results of the German collaborative study of phenylketonuria. *Acta Paediatr Suppl.* 1994;407:108-10.
- Burgard P, Luo X, GF H. Phenylketonuria. In: Sarafoglou k, Hoffmann G, Roth K, editores. *Pediatric Endocrinology and Inborn Errors of Metabolism.* New York: McGraw-Hill, 2009. p. 163-8.
- Burlina AB, Bonafé L, Ferrari V, Suppiej A, Zacchello F, Burlina AP. Measurement of neurotransmitter metabolites in the cerebrospinal fluid of phenylketonuric patients under dietary treatment. *J Inherit Metab Dis.* 2000;23(4):313-6.
- Burri R, Matthieu JM, Vandeveld M, Lazeyras F, Posse S, Herschkowitz N. Brain damage and recovery in hyperphenylalaninemic rats. *Dev Neurosci.* 1990a;12(2):116-25.
- Burri R, Steffen C, Stieger S, Brodbeck U, Colombo JP, Herschkowitz N. Reduced myelinogenesis and recovery in hyperphenylalaninemic

- rats. Correlation between brain phenylalanine levels, characteristic brain enzymes for myelination, and brain development. *Mol Chem Neuropathol.* 1990b;13(1-2):57-69.
- Butler IJ, O'Flynn ME, Seifert WE Jr, Howell RR. Neurotransmitter defects and treatment of disorders of hyperphenylalaninemia. *J Pediatr.* 1981;98(5):729-33.
- Butt AM, Hornby MF, Kirvell S, Berry M. Platelet-derived growth factor delays oligodendrocyte differentiation and axonal myelination in vivo in the anterior medullary velum of the developing rat. *J Neurosci Res.* 1997;48(6):588-96.
- Camp KM, Parisi MA, Acosta PB, Berry GT, Bilder DA, Blau N, Bodamer OA, Brosco JP, Brown CS, Burlina AB, Burton BK, Chang CS, Coates PM, Cunningham AC, Dobrowolski SF, Ferguson JH, Franklin TD, Frazier DM, Grange DK, Greene CL, Groft SC, Harding CO, Howell RR, Huntington KL, Hyatt-Knorr HD, Jevaji IP, Levy HL, Lichter-Konecki U, Lindegren ML, Lloyd-Puryear MA, Matalon K, MacDonald A, McPheeters ML, Mitchell JJ, Mofidi S, Moseley KD, Mueller CM, Mulberg AE, Nerurkar LS, Ogata BN, Pariser AR, Prasad S, Pridjian G, Rasmussen SA, Reddy UM, Rohr FJ, Singh RH, Sirrs SM, Stremer SE, Tagle DA, Thompson SM, Urv TK, Utz JR, van Spronsen F, Vockley J, Waisbren SE, Weglicki LS, White DA, Whitley CB, Wilfond BS, Yannicelli S, Young JM. Phenylketonuria Scientific Review Conference: State of the science and future research needs. *Mol Genet Metab.* 2014;112(2):87-122.
- Carter AR, Chen C, Schwartz PM, Segal RA. Brain-derived neurotrophic factor modulates cerebellar plasticity and synaptic ultrastructure. *J Neurosci.* 2002;22(4):1316-27.
- Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M, Krause KH. Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005;48(1):16-42.
- Carvalho TM. Resultados do levantamento epidemiológico da sociedade brasileira de triagem neonatal (SBTN). *Rev Méd Minas Gerais.* 2003;13(1 Supl 2):S109-35.
- Casey L. Caring for children with phenylketonuria. *Can Fam Physician.* 2013;59(8):837-40.
- Castillo M, Zafra MF, Garcia-Peregrin E. Inhibition of brain and liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase in experimental hyperphenylalaninemia. *Neurochem Res.* 1988;13(6):551-5.

- Castren E, Thoenen H, Lindholm D. Brain-derived neurotrophic factor messenger RNA is expressed in the septum, hypothalamus and in adrenergic brain stem nuclei of adult rat brain and is increased by osmotic stimulation in the paraventricular nucleus. *Neuroscience*. 1995;64(1):71-80.
- Cavallaro U, Dejana E. Adhesion molecule signalling: not always a sticky business. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(3):189-97.
- Channon S, German E, Cassina C, Lee P. Executive functioning, memory, and learning in phenylketonuria. *Neuropsychology*. 2004;18(4):613-20.
- Chen G, Kolbeck R, Barde YA, Bonhoeffer T, Kossel A. Relative contribution of endogenous neurotrophins in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci*. 1999;19(18):7983-90.
- Christ SE, Steiner RD, Grange DK, Abrams RA, White DA. Inhibitory control in children with phenylketonuria. *Dev Neuropsychol*. 2006;30(3):845-64.
- Christ SE. Asbjørn Følling and the discovery of phenylketonuria. *J Hist Neurosci*. 2003;12(1):44-54.
- Chwieralski CE, Welte T, Bühling F. Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis*. 2006;11(2):143-9.
- Ciammola A, Sassone J, Cannella M, Calza S, Poletti B, Frati L, Squitieri F, Silani V. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of Huntington's disease patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2007;144B(4):574-7.
- Clearly MA, Walter JH, Wraith JE, Jenkins JP, Alani SM, Tyler K, Whittle D. Magnetic resonance imaging of the brain in phenylketonuria. *Lancet*. 1994;344(8915):87-90.
- Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J*. 1995;9(10):899-909.
- Costabeber E, Kessler A, Severo Dutra-Filho C, de Souza Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM. Hyperphenylalaninemia reduces creatine kinase activity in the cerebral cortex of rats. *Int J Dev Neurosci*. 2003;21(2):111-6.
- Cullen V, Lindfors M, Ng J, Paetau A, Swinton E, Kolodziej P, Boston H, Saftig P, Woulfe J, Feany MB, Myllykangas L, Schlossmacher MG, Tyynelä J. Cathepsin D expression level affects alpha-synuclein processing, aggregation, and toxicity in vivo. *Mol Brain*. 2009;2:5.
- Cuzner ML, Gveric D, Strand C, Loughlin AJ, Paemen L, Opdenakker G, Newcombe J. The expression of tissue-type plasminogen activator,

- matrix metalloproteases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: comparison of stages in lesion evolution. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996;55(12):1194-204.
- Deon M, Sitta A, Faverzani JL, Guerreiro GB, Donida B, Marchetti DP, Mescka CP, Ribas GS, Coitinho AS, Wajner M, Vargas CR. Urinary biomarkers of oxidative stress and plasmatic inflammatory profile in phenylketonuric treated patients. *Int J Dev Neurosci.* 2015;47(Pt B):259-65.
- Doherty P, Walsh FS. Cell adhesion molecules, second messengers and axonal growth. *Curr Opin Neurobiol.* 1992;2(5):595-601.
- Dong XX, Wang Y, Qin ZH. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin.* 2009;30(4):379-87.
- Du Y, Fischer TZ, Clinton-Luke P, Lercher LD, Dreyfus CF. Distinct effects of p75 in mediating actions of neurotrophins on basal forebrain oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci.* 2006a;31(2):366-75.
- Du Y, Lercher LD, Zhou R, Dreyfus CF. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates effects of brain-derived neurotrophic factor on differentiation of basal forebrain oligodendrocytes. *J Neurosci Res.* 2006b;84(8):1692-702.
- Duman RS, Voleti B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends Neurosci.* 2012;35(1):47-56.
- Dunn AD, Crutchfield HE, Dunn JT. Thyroglobulin processing by thyroidal proteases. Major sites of cleavage by cathepsins B, D, and L. *J Biol Chem.* 1991;266(30):20198-204.
- Dyer CA. Pathophysiology of phenylketonuria. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 1999;5:104-12.
- East E, Baker D, Pryce G, Lijnen HR, Cuzner ML, Gverić D. A role for the plasminogen activator system in inflammation and neurodegeneration in the central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *Am J Pathol.* 2005;167(2):545-54.
- Emery B. Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science.* 2010;330(6005):779-82.
- Everse J, Coates PW. Neurodegeneration and peroxidases. *Neurobiol Aging.* 2009;30(7):1011-25.
- Federico A, Cardaioli E, Da Pozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J Neurol Sci.* 2012;322(1-2):254-62.
- Feillet F, Agostoni C. Nutritional issues in treating phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(6):659-64.

- Feksa LR, Cornelio AR, Rech VC, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM. Alanine prevents the reduction of pyruvate kinase activity in brain cortex of rats subjected to chemically induced hyperphenylalaninemia. *Neurochem Res.* 2002;27(9):947-52.
- Fernandes BS, Molendijk ML, Köhler CA, Soares JC, Leite CM, Machado-Vieira R, Ribeiro TL, Silva JC, Sales PM, Quevedo J, Oertel-Knöchel V, Vieta E, González-Pinto A, Berk M, Carvalho AF. Peripheral brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as a biomarker in bipolar disorder: a meta-analysis of 52 studies. *BMC Med.* 2015;13:289.
- Ferreira AG, Scherer EB, da Cunha MJ, Machado FR, Cunha AA, Graeff JS, Netto CA, Wyse AT. Physical exercise reverses cognitive impairment in rats subjected to experimental hyperprolinemia. *Neurochem Res.* 2011;36(12):2306-15.
- Flydal MI, Martinez A. Phenylalanine hydroxylase: function, structure, and regulation. *IUBMB Life.* 2013;65(4):341-9.
- Flynn G, Maru S, Loughlin J, Romero IA, Male D. Regulation of chemokine receptor expression in human microglia and astrocytes. *J Neuroimmunol.* 2003;136(1-2):84-93.
- Fölling A. Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Inbicillität. *Hoppe Seyler's. Z Physiol Chem.* 1934;227:169-76.
- Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15(4):197-204.
- Friedman WJ, Olson L, Persson H. Cells that express brain-derived neurotrophic factor mRNA in the developing postnatal rat brain. *Eur J Neurosci.* 1991;3(7):688-697.
- Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, Kambayashi J, Sun B, Tandon NN. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb Haemost.* 2002;87(4):728-34.
- Galbusera C, Orth P, Fedida D, Spector T. Superoxide radical production by allopurinol and xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol.* 2006;71(12):1747-52.
- Gałecki P, Gałecka E, Maes M, Chamielec M, Orzechowska A, Bobińska K, Lewiński A, Szemraj J. The expression of genes encoding for COX-2, MPO, iNOS, and sPLA2-IIA in patients with recurrent depressive disorder. *J Affect Disord.* 2012;138(3):360-6.
- Gall CM, Gold SJ, Isackson PJ, Seroogy KB. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs are expressed in ventral

- midbrain regions containing dopaminergic neurons. *Mol Cell Neurosci.* 1992;3(1):56-63.
- Genetics Home Reference [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2016 [citado em 2016 Jun 9]. Disponível em: <http://ghr.nlm.nih.gov/>.
- Gentile JK, Ten Hoedt AE, Bosch AM. Psychosocial aspects of PKU: hidden disabilities--a review. *Mol Genet Metab.* 2010;99 Suppl 1:S64-7.
- Ghandi S, Abramov AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:428010.
- Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Ande SR, Jangamreddy JR, Mehrpour M, Christoffersson J, Chaabane W, Moghadam AR, Kashani HH, Hashemi M, Owji AA, Los MJ. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol.* 2014;112:24-49.
- Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell.* 2010;140(6): 918–934.
- Gnanapavan S, Giovannoni G. Neural cell adhesion molecules in brain plasticity and disease. *Mult Scler Relat Disord.* 2013;2(1):13-20.
- Gray E, Thomas TL, Betmouni S, Scolding N, Love S. Elevated activity and microglial expression of myeloperoxidase in demyelinated cerebral cortex in multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 2008;18(1):86-95.
- Green PS, Mendez AJ, Jacob JS, Crowley JR, Growdon W, Hyman BT, Heinecke JW. Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2004;90(3):724-33.
- Grinspan JB, Franceschini B. Platelet-derived growth factor is a survival factor for PSA-NCAM1 oligodendrocyte progenitor cells. *J Neurosci Res.* 1995;41(4):540-51.
- Guthrie KM e Gall CM. Differential expression of mRNAs for the NGF family of neurotrophic factors in the adult rat central olfactory system. *J Comp Neurol.* 1991;313(1):95-102.
- Güttler F, Lou H. Dietary problems of phenylketonuria: effect on CNS transmitters and their possible role in behaviour and neuropsychological function. *J Inher Metab Dis.* 1986;9 Suppl 2:169-77.
- Gveric D, Herrera B, Petzold A, Lawrence DA, Cuzner ML. Impaired fibrinolysis in multiple sclerosis: a role for tissue plasminogen activator inhibitors. *Brain.* 2003;126(Pt 7):1590-8.
- Haendeler J, Popp R, Goy C, Tischler V, Zeiher AM, Dimmeler S. Cathepsin D and H₂O₂ stimulate degradation of thioredoxin-1: implication for endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem.* 2005;280(52):42945-51.

- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 5^a ed. New York: Oxford University Press Inc; 2015.
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. 1998;92(9):3007-17.
- Harirchian MH, Tekieh AH, Modabbernia A, Aghamollai V, Tafakhori A, Ghaffarpour M, Sahraian MA, Naji M, Yazdankhah M. Serum and CSF PDGF-AA and FGF-2 in relapsing-remitting multiple sclerosis: a case-control study. *Eur J Neurol*. 2012;19(2):241-7.
- Hart IK, Richardson WD, Bolsover SR, Raff MC. PDGF and intracellular signaling in the timing of oligodendrocyte differentiation. *J Cell Biol*. 1989;109(6 Pt 2):3411-7.
- Hashimoto K. Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker for mood disorders: an historical overview and future directions. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2010;64(4):341-57.
- Hasilik A, Neufeld EF. Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Synthesis as precursors of higher molecular weight. *J Biol Chem*. 1980;255(10):4937-45.
- Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B in immunobiology. *Cell Res*. 2011;21(2):223-44.
- Heinrich M, Neumeyer J, Jakob M, Hallas C, Tchikov V, Winoto-Morbach S, Wickel M, Schneider-Brachert W, Trauzold A, Hethke A, Schütze S. Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death Differ*. 2004;11(5):550-63.
- Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*. 1999;79(4):1283-316.
- Hiraiwa M, Martin BM, Kishimoto Y, Conner GE, Tsuji S, O'Brien JS. Lysosomal proteolysis of prosaposin, the precursor of saposins (sphingolipid activator proteins): its mechanism and inhibition by ganglioside. *Arch Biochem Biophys*. 1997;341(1):17-24.
- Holven KB, Damås JK, Yndestad A, Waehre T, Ueland T, Halvorsen B, Heggelund L, Sandberg WJ, Semb AG, Frøland SS, Ose L, Nenseter MS, Aukrust P. Chemokines in children with heterozygous familial hypercholesterolemia: selective upregulation of RANTES. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(1):200-5.
- Hommes FA. On the mechanism of permanent brain dysfunction in hyperphenylalaninemia. *Biochem Med Metab Biol*. 1991;46(3):277-87.
- Horstkorte R, Fuss B. Cell adhesion molecules. In: Brady ST, Siegel GJ, Albers W, Price DL, editores. *Basic Neurochemistry*. San Diego:

- Academic Press; 2012. p. 165-78.
- Ho-Tin-Noé B, Enslin H, Doeuvre L, Corsi JM, Lijnen HR, Anglés-Cano E. Role of plasminogen activation in neuronal organization and survival. *Mol Cell Neurosci.* 2009;42(4):288-95.
- Hroudová J, Singh N, Fišar Z. Mitochondrial dysfunctions in neurodegenerative diseases: relevance to Alzheimer's disease. *Biomed Res Int.* 2014;2014:175062.
- Hu JG, Fu SL, Wang YX, Li Y, Jiang XY, Wang XF, Qiu MS, Lu PH, Xu XM. Platelet-derived growth factor-AA mediates oligodendrocyte lineage differentiation through activation of extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Neuroscience.* 2008;151(1):138-47.
- Hu JG, Wang YX, Wang HJ, Bao MS, Wang ZH, Ge X, Wang FC, Zhou JS, Lü HZ. PDGF-AA mediates B104CM-induced oligodendrocyte precursor cell differentiation of embryonic neural stem cells through Erk, PI3K, and p38 signaling. *J Mol Neurosci.* 2012;46(3):644-53.
- Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:677-736.
- Huang Y, Dreyfus CF. The role of growth factors as a therapeutic approach to demyelinating disease. *Exp Neurol.* 2016;S0014-4886(16)30039-5.
- Huether G, Klapproth M, Neuhoff V. Fatty acid composition of myelin lipids from developing rat forebrain and spinal cord: influence of experimental hyperphenylalaninaemia. *Neurochem Res.* 1986;11(9):1303-11.
- Imperlini E, Orrù S, Corbo C, Daniele A, Salvatore F. Altered brain protein expression profiles are associated with molecular neurological dysfunction in the PKU mouse model. *J Neurochem.* 2014;129(6):1002-12.
- Irigoyen JP, Muñoz-Cánoves P, Montero L, Koziczak M, Nagamine Y. The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci.* 1999;56(1-2):104-32.
- Johnstone M, Gearing AJ, Miller KM. A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *J Neuroimmunol.* 1999;93(1-2):182-93.
- Jørgensen OS, Brooksbank BW, Balázs R. Neuronal plasticity and astrocytic reaction in Down syndrome and Alzheimer disease. *J Neurol Sci.* 1990;98(1):63-79.

- Joseph MH, Marsden CA. Amino acids and small peptides. In: Lim CF, editor. *HPLC of Small Peptides*. Oxford: IRL Press; 1986. p. 13–27.
- Jucaite A, Svenningsson P, Rinne JO, Cselenyi Z, Varnas K, Johnstrom P, Amini N, Kirjavainen A, Helin S, Minkwitz M, Kugler AR, Posener JA, Budd S, Halldin C, Varrone A, Farde L. Effect of the myeloperoxidase inhibitor AZD3241 on microglia: a PET study in Parkinson's disease. *Brain*. 2015;138(Pt 9):2687-2700.
- Karege F, Schwald M, Cisse M. Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neurosci Lett*. 2002;328(3):261-4.
- Kegel KB, Kim M, Sapp E, McIntyre C, Castaño JG, Aronin N, DiFiglia M. Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci*. 2000;20(19):7268-78.
- Kim YJ, Sapp E, Cuiffo BG, Sobin L, Yoder J, Kegel KB, Qin ZH, Detloff P, Aronin N, DiFiglia M. Lysosomal proteases are involved in generation of N-terminal huntingtin fragment. *Neurobiol Dis*. 2006;22(2):346-56.
- Kiss JZ, Muller D. Contribution of the neural cell adhesion molecule to neuronal and synaptic plasticity. *Rev. Neurosci*. 2001;12(4):297-310.
- Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*. 2005;77(5):598-625.
- Klegeris A, McGeer EG, McGeer PL. Therapeutic approaches to inflammation in neurodegenerative disease. *Curr Opin Neurol*. 2007;20(3):351-7.
- Klein AB, Williamson R, Santini MA, Clemmensen C, Ettrup A, Rios M, Knudsen GM, Aznar S. Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011;14(3):347-53.
- 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. Phenylketonuria in adulthood: a collaborative study. *J Inherit Metab Dis*. 2002;25(5):333-46.
- Kornfeld S. Lysosomal enzyme targeting. *Biochem Soc Trans*. 1990;18(3):367-74.
- Krensky AM, Ahn YT. Mechanisms of disease: regulation of RANTES (CCL5) in renal disease. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2007;3(3):164-70.
- Kudo S, Miyamoto G, Kawano K. Proteases involved in the metabolic

- degradation of human interleukin-1beta by rat kidney lysosomes. *J Interferon Cytokine Res.* 1999;19(4):361-7.
- Lee JL, Everitt BJ, Thomas KL. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science.* 2004;304(5672):839-43.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science.* 2001;294(5548):1945-8.
- Lefkowitz DL, Lefkowitz SS. Microglia and myeloperoxidase: A deadly partnership in neurodegenerative disease. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(5):726-31.
- Lenarcic B, Krasovec M, Ritonja A, Olafsson I, Turk V. Inactivation of human cystatin C and kininogen by human cathepsin D. *FEBS Lett.* 1991;280(2):211-5.
- Levine JM, Reynolds R, Fawcett JW. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci.* 2001;24(1):39-47.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(9):678-89.
- Li D, Gu X, Lu L, Liang L. Effects of phenylalanine on the survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in primary cultures: possible involvement of brain-derived neurotrophic factor. *Mol Cell Biochem.* 2010;339(1-2):1-7.
- Liaudet-Coopman E, Beaujouin M, Derocq D, Garcia M, Glondu-Lassis M, Laurent-Matha V, Prébois C, Rochefort H, Vignon F. Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. *Cancer Lett.* 2006;237(2):167-79.
- Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev.* 2007;65(12 Pt 2):S140-6.
- Liu Y, Zhou J. Oligodendrocytes in neurodegenerative diseases. *Front Biol.* 2013;8(2):127-133.
- Lu B, Nagappan G, Lu Y. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handb Exp Pharmacol.* 2014;220:223-50.
- Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol.* 2006;147 Suppl 1:S232-40.
- Lykkelund C, Nielsen JB, Lou HC, Rasmussen V, Gerdes AM, Christensen E, Güttler F. Increased neurotransmitter biosynthesis in phenylketonuria induced by phenylalanine restriction or by supplementation of unrestricted diet with large amounts of tyrosine. *Eur J Pediatr.* 1988;148(3):238-45.
- Macan TP. Avaliação dos efeitos da hiperfenilalaninemia sobre parâmetros neuroinflamatórios em córtex cerebral de ratos jovens.

- [dissertação de mestrado]. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2013.
- MacDonald A, van Rijn M, Feillet F, Lund AM, Bernstein L, Bosch AM, Gizewska M, van Spronsen FJ. Adherence issues in inherited metabolic disorders treated by low natural protein diets. *Ann Nutr Metab.* 2012;61(4):289-95.
- MacLeod EL, Ney DM. Nutritional management of phenylketonuria. *Ann Nestle Eng.* 2010;68(2):58-69.
- Mahlknecht P, Stemberger S, Sprenger F, Rainer J, Hametner E, Kirchmair R, Grabmer C, Scherfler C, Wenning GK, Seppi K, Poewe W, Reindl M. An antibody microarray analysis of serum cytokines in neurodegenerative Parkinsonian syndromes. *Proteome Sci.* 2012;10(1):71.
- Maki RA, Tyurin VA, Lyon RC, Hamilton RL, DeKosky ST, Kagan VE, Reynolds WF. Aberrant expression of myeloperoxidase in astrocytes promotes phospholipid oxidation and memory deficits in a mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 2009;284(5):3158-3169.
- Mantovani A, Bussolino F, Introna M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol Today.* 1997;18(5):231-40.
- Matté C, Pereira LO, Dos Santos TM, Mackedanz V, Cunha AA, Netto CA, Wyse AT. Acute homocysteine administration impairs memory consolidation on inhibitory avoidance task and decreases hippocampal brain-derived neurotrophic factor immunoccontent: prevention by folic acid treatment. *Neuroscience.* 2009;163(4):1039-45.
- Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1(2):120-9.
- McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(4):a026716.
- McKean CM. The effects of high phenylalanine concentrations on serotonin and catecholamine metabolism in the human brain. *Brain Res.* 1972;47(2):469-76.
- Meager A. Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1999;10(1):27-39.
- Miklossy J, Doudet DD, Schwab C, Yu S, McGeer EG, McGeer PL. Role of ICAM-1 in persisting inflammation in Parkinson disease and MPTP monkeys. *Exp Neurol.* 2006;197(2):275-83.
- Miller RH. Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Prog Neurobiol.* 2002;67(6):451-67.

- Minichiello L, Korte M, Wolfer D, Kühn R, Unsicker K, Cestari V, Rossi-Arnaud C, Lipp HP, Bonhoeffer T, Klein R. Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron*. 1999;24(2):401-14.
- Minichiello L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(12):850-60.
- Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Atenção à Saúde, Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas. Fenilcetonúria. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
- Mitchell JJ, Trakadis YJ, Scriver CR. Phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genet Med*. 2011;13(8):697-707.
- Mitew S, Hay CM, Peckham H, Xiao J, Koenning M, Emery B. Mechanisms regulating the development of oligodendrocytes and central nervous system myelin. *Neuroscience*. 2014;276:29-47.
- Mori F, Rossi S, Piccinin S, Motta C, Mango D, Kusayanagi H, Bergami A, Studer V, Nicoletti CG, Buttari F, Barbieri F, Mercuri NB, Martino G, Furlan R, Nisticò R, Centonze D. Synaptic plasticity and PDGF signaling defects underlie clinical progression in multiple sclerosis. *J Neurosci*. 2013;33(49):19112-9.
- Muller D, Djebbara-Hannas Z, Jourdain P, Vutskits L, Durbec P, Rougon G, Kiss JZ. Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(8):4315-20.
- Murphy G, Docherty AJ. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992;7(2):120-5.
- Nagra RM, Becher B, Tourtellotte WW, Antel JP, Gold D, Paladino T, Smith RA, Nelson JR, Reynolds WF. Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 1997;78(1-2):97-107.
- Nase S, Köhler S, Jennebach J, Eckert A, Schweinfurth N, Gallinat J, Lang UE, Kühn S. Role of serum brain derived neurotrophic factor and central n-acetylaspartate for clinical response under antidepressive pharmacotherapy. *Neurosignals*. 2016;24(1):1-14.
- Nave KA, Werner HB. Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:503-33.
- Nelson DL, Cox MM. *Lehninger: princípios de bioquímica*. 6ª ed. New York: Worth Publishers, 2014.
- Ngo ST, Steyn FJ, Huang L, Mantovani S, Pfluger CM, Woodruff TM, O'Sullivan JD, Henderson RD, McCombe PA. Altered expression of metabolic proteins and adipokines in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 2015;357(1-2):22-7.

- Nichols BA, Bainton DF. Differentiation of human monocytes in bone marrow and blood. Sequential formation of two granule populations. *Lab Invest.* 1973;29(1):27-40.
- Nishimura Y, Kawabata T, Furuno K, Kato K. Evidence that aspartic proteinase is involved in the proteolytic processing event of procathepsin L in lysosomes. *Arch Biochem Biophys.* 1989;271(2):400-6.
- Nishimura Y, Kawabata T, Kato K. Identification of latent procathepsins B and L in microsomal lumen: characterization of enzymatic activation and proteolytic processing in vitro. *Arch Biochem Biophys.* 1988;261(1):64-71.
- Noble M, Murray K, Stroobant P, Waterfield MD, Riddle P. Platelet-derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/ type-2 astrocyte progenitor cell. *Nature.* 1988;333(6173):560-2.
- Oh HJ, Lee H, Park JW, Rhee H, Koo SK, Kang S, Jo I, Jung SC. Reversal of gene expression profile in the phenylketonuria mouse model after adeno-associated virus vector-mediated gene therapy. *Mol Genet Metab.* 2005;86 Suppl 1:S124-32.
- Okouchi M, Ekshyyan O, Maracine M, Aw TY. Neuronal apoptosis in neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(8):1059-96.
- Ono K, Suzuki H, Sawada M. Delayed neural damage is induced by iNOS-expressing microglia in a brain injury model. *Neurosci Lett.* 2010;473(2):146-50.
- Opdenakker G, Van Damme J. Cytokines and proteases in invasive processes: molecular similarities between inflammation and cancer. *Cytokine.* 1992;4(4):251-8.
- Palsler AL, Norman AL, Saffell JL, Reynolds R. Neural cell adhesion molecule stimulates survival of premyelinating oligodendrocytes via the fibroblast growth factor receptor. *J Neurosci Res.* 2009;87(15):3356-68.
- Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J, Kastin AJ. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology.* 1998;37(12):1553-61.
- Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL, Lu B. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science.* 2004;306(5695):487-91.
- Pardridge WM. Blood-brain barrier carrier-mediated transport and brain metabolism of amino acids. *Neurochem Res.* 1998;23(5):635-44.

- Park H, Poo MM. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(1):7-23.
- Pascucci T, Ventura R, Puglisi-Allegra S, Cabib S. Deficits in brain serotonin synthesis in a genetic mouse model of phenylketonuria. *Neuroreport*. 2002;13(18):2561-4.
- Perry VH. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain Behav Immun*. 2004;18(5):407-13.
- Persohn E, Schachner M. Immunoelectron-microscopic localization of the neural cell adhesion molecules L1 and N-CAM during postnatal development of the mouse cerebellum. I. *Cell. Biol*. 1987;105(1):569-76.
- Pietz J, Fätkenheuer B, Burgard P, Armbruster M, Esser G, Schmidt H. Psychiatric disorders in adult patients with early-treated phenylketonuria. *Pediatrics*. 1997;99(3):345-50.
- Pimenta DC, Chen VC, Chao J, Juliano MA, Juliano L. Alpha1-antichymotrypsin and kallistatin hydrolysis by human cathepsin D. *J Protein Chem*. 2000;19(5):411-8.
- Piwnica D, Touraine P, Struman I, Tabruyn S, Bolbach G, Clapp C, Martial JA, Kelly PA, Goffin V. Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance. *Mol Endocrinol*. 2004;18(10):2522-42.
- Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(1):24-32.
- Poustie VJ e Wildgoose J. Dietary interventions for phenylketonuria. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;20(1):CD001304.
- Pringle N, Collarini EJ, Mosley MJ, Heldin CH, Westermark B, Richardson WD. PDGF A chain homodimers drive proliferation of bipotential (O-2A) glial progenitor cells in the developing rat optic nerve. *EMBO J*. 1989;8(4):1049-56.
- Puglisi-Allegra S, Cabib S, Pascucci T, Ventura R, Cali F, Romano V. Dramatic brain aminergic deficit in a genetic mouse model of phenylketonuria. *Neuroreport*. 2000;11(6):1361-4.
- Raff MC, Abney ER, Fok-Seang J. Reconstitution of a developmental clock in vitro: a critical role for astrocytes in the timing of oligodendrocyte differentiation. *Cell*. 1985;42(1):61-9.
- Raff MC, Lillien LE, Richardson WD, Burne JF, Noble MD. Platelet-derived growth factor from astrocytes drives the clock that times oligodendrocyte development in culture. *Nature*. 1988;333(6173):562-5.

- Ramos-Cejudo J, Gutiérrez-Fernández M, Otero-Ortega L, Rodríguez-Frutos B, Fuentes B, Vallejo-Cremades MT, Hernanz TN, Cerdán S, Díez-Tejedor E. Brain-derived neurotrophic factor administration mediated oligodendrocyte differentiation and myelin formation in subcortical ischemic stroke. *Stroke*. 2015;46(1):221-8.
- Ray RS, Katyal A. Myeloperoxidase: bridging the gap in neurodegeneration. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016;S0149-7634(16)30048-3.
- Rech VC, Feksa LR, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM. Inhibition of the mitochondrial respiratory chain by phenylalanine in rat cerebral cortex. *Neurochem Res*. 2002;27(5):353-7.
- Rentzos M, Michalopoulou M, Nikolaou C, Cambouri C, Rombos A, Dimitrakopoulos A, Vassilopoulos D. The role of soluble intracellular adhesion molecules in neurodegenerative disorders. *J Neurol Sci*. 2005;228(2):129-35.
- Reynolds R, Cenci di Bello I, Dawson M, Levine J. The response of adult oligodendrocyte progenitors to demyelination in EAE. *Prog Brain Res*. 2001;132:165-74.
- Reynolds R, Burri R, Mahal S, Herschkowitz N. Disturbed myelinogenesis and recovery in hyperphenylalaninemia in rats: an immunohistochemical study. *Exp Neurol*. 1992;115(3):347-67.
- Richardson WD, Pringle N, Mosley MJ, Westermark B, Dubois-Dalcq M. A role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system. *Cell*. 1988;53(2):309-19.
- Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost*. 2009;7(1):4-13.
- Ris MD, Weber AM, Hunt MM, Berry HK, Williams SE, Leslie N. Adult psychosocial outcome in early-treated phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis*. 1997;20(4):499-508.
- Ris MD, Williams SE, Hunt MM, Berry HK, Leslie N. Early-treated phenylketonuria: adult neuropsychologic outcome. *J Pediatr*. 1994;124(3):388-92.
- Rønn LCB, Berezin V, Bock E. The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing. *Int J Dev Neurosci*. 2000;18(2-3):193-9.
- Rutishauser U, Acheson A, Hall AK, Mann DM, Sunshine J. The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions. *Science*. 1988;240(4848):53-7.
- Saftig P, Peters C, von Figura K, Craessaerts K, Van Leuven F, De Strooper B. Amyloidogenic processing of human amyloid precursor

- protein in hippocampal neurons devoid of cathepsin D. *J Biol Chem.* 1996;271(44):27241-4.
- Salińska E, Danysz W, Łazarewicz JW. The role of excitotoxicity in neurodegeneration. *Folia Neuropathol.* 2005;43(4):322-39.
- Sanayama Y, Nagasaka H, Takayanagi M, Ohura T, Sakamoto O, Ito T, Ishige-Wada M, Usui H, Yoshino M, Ohtake A, Yorifuji T, Tsukahara H, Hirayama S, Miida T, Fukui M, Okano Y. Experimental evidence that phenylalanine is strongly associated to oxidative stress in adolescents and adults with phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2011;103(3):220-5.
- Saudubray JM, Berghe GVD, Walter JH. Inborn metabolic diseases. Diagnosis and Treatment. 5^a ed. Germany: Springer; 2012.
- Scalzo P, Kümmer A, Bretas TL, Cardoso F, Teixeira AL. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with motor impairment in Parkinson's disease. *J Neurol.* 2010;257(4):540-5.
- Schall TJ, Jongstra J, Dyer BJ, Jorgensen J, Clayberger C, Davis MM, Krensky AM. A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *J Immunol.* 1988;141(3):1018-25.
- Schall TJ. Biology of the RANTES/SIS cytokine Family. *Cytokine.* 1991;3(3):165-83.
- Schonfeld-Dado E, Segal M. Activity deprivation induces neuronal cell death: mediation by tissue-type plasminogen activator. *PLoS One.* 2011;6(10):e25919.
- Schröter J, Schott KJ, Purtil MA, Neuhoff V. Lysosomal protein degradation in experimental hyperphenylalaninaemia. *J Inher Metab Dis.* 1986;9(3):273-82.
- Schuck PF, Malgarin F, Cararo JH, Cardoso F, Streck EL, Ferreira GC. Phenylketonuria pathophysiology: on the role of metabolic alterations. *Aging Dis.* 2015;6(5):390-9.
- Schulpis KH, Kariyannis C, Papassotiriou I. Serum levels of neural protein S-100B in phenylketonuria. *Clin Biochem.* 2004;37(1):76-9.
- Schulpis KH, Papassotiriou I, Tsakiris S, Vounatsou M, Chrousos GP. Increased plasma adiponectin concentrations in poorly controlled patients with phenylketonuria normalize with a strict diet: evidence for catecholamine-mediated adiponectin regulation and a complex effect of phenylketonuria diet on atherogenesis risk factors. *Metabolism.* 2005b;54(10):1350-5.
- Schulpis KH, Tsakiris S, Traeger-Synodinos J, Papassotiriou I. Low total antioxidant status is implicated with high 8-hydroxy-2-deoxyguanosine serum concentrations in phenylketonuria. *Clin Biochem.* 2005a;38(3):239-42.

- Schultz J, Kaminker K. Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localization. *Arch Biochem Biophys.* 1962;96:465-7.
- Schuster T, Krug M, Stalder M, Hackel N, Gerardy-Schahn R, Schachner M. Immunoelectron microscopic localization of the neural recognition molecules L1, NCAM, and its isoform NCAM180, the NCAM-associated polysialic acid, beta1 integrin and the extracellular matrix molecule tenascin-R in synapses of the adult rat hippocampus. *J Neurobiol.* 2001;49(2):142-58.
- Scriver CR, Beaudet A, Sky WS, Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8^a ed. New York: McGraw-Hill; 2001.
- Shefer S, Tint GS, Jean-Guillaume D, Daikhin E, Kendler A, Nguyen LB, Yudkoff M, Dyer CA. Is there a relationship between 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase activity and forebrain pathology in the PKU mouse? *J Neurosci Res.* 2000;61(5):549-63.
- Siegel GJ, Chauhan NB. Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000;33:199-227.
- Simpson J, Rezaie P, Newcombe J, Cuzner ML, Male D, Woodrooffe MN. Expression of the beta-chemokine receptors CCR2, CCR3 and CCR5 in multiple sclerosis central nervous system tissue. *J Neuroimmunol.* 2000;108(1-2):192-200.
- Sirtori LR, Dutra-Filho CS, Fitarelli D, Sitta A, Haeser A, Barschak AG, Wajner M, Coelho DM, Llesuy S, Belló-Klein A, Giugliani R, Deon M, Vargas CR. Oxidative stress in patients with phenylketonuria. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1740(1):68-73.
- Sitta A, Barschak AG, Deon M, Barden AT, Biancini GB, Vargas PR, de Souza CF, Netto C, Wajner M, Vargas CR. Effect of short- and long-term exposition to high phenylalanine blood levels on oxidative damage in phenylketonuric patients. *Int J Dev Neurosci.* 2009c;27(3):243-7.
- Sitta A, Barschak AG, Deon M, de Mari JF, Barden AT, Vanzin CS, Biancini GB, Schwartz IV, Wajner M, Vargas CR. L-carnitine blood levels and oxidative stress in treated phenylketonuric patients. *Cell Mol Neurobiol.* 2009b;29(2):211-8.
- Sitta A, Barschak AG, Deon M, Terroso T, Pires R, Giugliani R, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR. Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. *Metab Brain Dis.* 2006;21(4):287-96.
- Sitta A, Manfredini V, Biasi L, Treméa R, Schwartz IV, Wajner M, Vargas CR. Evidence that DNA damage is associated to

- phenylalanine blood levels in leukocytes from phenylketonuric patients. *Mutat Res.* 2009a;679(1-2):13-6. Skoff RP, Benjamins JA. Oligodendrocytes. In: Aminoff, MJ, Daroff RB, editores. *Encyclopedia of the Neurological Sciences*. San Diego: Academic Press; 2014. p. 643-7.
- Smith I, Beasley MG, Wolff OH, Ades AE. Behavior disturbance in 8-year-old children with early treated phenylketonuria. Report from the MRC/DHSS Phenylketonuria Register. *J Pediatr.* 1988;112(3):403-8.
- Solverson P, Murali SG, Brinkman AS, Nelson DW, Clayton MK, Yen CL, Ney DM. Glycomacropeptide, a low-phenylalanine protein isolated from cheese whey, supports growth and attenuates metabolic stress in the murine model of phenylketonuria. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;302(7):E885-95.
- Sørensen TL, Tani M, Jensen J, Pierce V, Lucchinetti C, Folcik VA, Qin S, Rottman J, Sellebjerg F, Strieter RM, Frederiksen JL, Ransohoff RM. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest.* 1999;103(6):807-15.
- Streit WJ. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia.* 2002;40(2):133-9.
- Strisciuglio P, Concolino D. New strategies for the treatment of phenylketonuria (PKU). *Metabolites.* 2014;4(4):1007-17.
- Sun W, Wang G, Zhang ZM, Zeng XK, Wang X. Chemokine RANTES is upregulated in monocytes from patients with hyperhomocysteinemia. *Acta Pharmacol Sin.* 2005;26(11):1317-21.
- Surtees R, Blau N. The neurochemistry of phenylketonuria. *Eur J Pediatr.* 2000;159 Suppl 2:S109-13.
- Takei Y, Higashira H, Yamamoto T, Hayashi K. Mitogenic activity toward human breast cancer cell line MCF-7 of two bFGFs purified from sera of breast cancer patients: co-operative role of cathepsin D. *Breast Cancer Res Treat.* 1997;43(1):53-63.
- Teismann P. Myeloperoxidase in the neurodegenerative process of Parkinson's disease. *Dtsch Med Wochenschr.* 2014;139(3):99-102.
- Tsai SJ. The P11, tPA/plasminogen system and brain-derived neurotrophic factor: Implications for the pathogenesis of major depression and the therapeutic mechanism of antidepressants. *Med Hypotheses.* 2007;68(1):180-3.
- Tsakiris S, Schulpis KH, Tjamouranis J, Michelakakis H, Karikas GA. Reduced acetylcholinesterase activity in erythrocyte membranes from patients with phenylketonuria. *Clin Biochem.* 2002;35(8):615-9.

- Ushakova GA, Gubkina HA, Kachur VA, Lepekhin EA. Effect of experimental hyperphenylalaninemia on the postnatal rat brain. *Int J Dev Neurosci.* 1997;15(1):29-36.
- Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol.* 2009;7(1):65-74.
- Vaccarino V, Brennan ML, Miller AH, Bremner JD, Ritchie JC, Lindau F, Veledar E, Su S, Murrah NV, Jones L, Jawed F, Dai J, Goldberg J, Hazen SL. Association of major depressive disorder with serum myeloperoxidase and other markers of inflammation: a twin study. *Biol Psychiatry.* 2008;64(6):476-83.
- Vairo F, Sperb-Ludwig F, Wilke M, Michellin-Tirelli K, Netto C, Neto EC, Doederlein Schwartz IV. Brain-derived neurotrophic factor expression increases after enzyme replacement therapy in Gaucher disease. *J Neuroimmunol.* 2015;278:190-3.
- Van De Craen B, Declerck PJ, Gils A. The biochemistry, physiology and pathological roles of PAI-1 and the requirements for PAI-1 inhibition in vivo. *Thromb Res.* 2012;130(4):576-85.
- van der Meer P, Ulrich AM, González-Scarano F, Lavi E. Immunohistochemical analysis of CCR2, CCR3, CCR5, and CXCR4 in the human brain: potential mechanisms for HIV dementia. *Exp Mol Pathol.* 2000;69(3):192-201.
- van der Stappen JW, Williams AC, Maciewicz RA, Paraskeva C. Activation of cathepsin B, secreted by a colorectal cancer cell line requires low pH and is mediated by cathepsin D. *Int J Cancer.* 1996;67(4):547-54.
- van Spronsen FJ, Hoeksma M, Reijngoud DJ. Brain dysfunction in phenylketonuria: is phenylalanine toxicity the only possible cause? *J Inherit Dis.* 2009;32(1):46-51.
- Van't Veer A, Du Y, Fischer TZ, Boetig DR, Wood MR, Dreyfus CF. Brain-derived neurotrophic factor effects on oligodendrocyte progenitors of the basal forebrain are mediated through trkB and the MAP kinase pathway. *J Neurosci Res.* 2009;87(1):69-78.
- Verbeek MM, Otte-Höller I, Westphal JR, Wesseling P, Ruiters DJ, de Waal RM. Accumulation of intracellular adhesion molecule-1 in senile plaques in brain tissue of patients with Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 1994;144(1):104-16.
- Vondran MW, Clinton-Luke P, Honeywell JZ, Dreyfus CF. BDNF+/- mice exhibit deficits in oligodendrocyte lineage cells of the basal forebrain. *Glia.* 2010;58(7):848-56.

- Vutskits L, Djebbara-Hannas Z, Zhang H, Paccaud JP, Durbec P, Rougon G, Muller D, Kiss JZ. PSA-NCAM modulates BDNF-dependent survival and differentiation of cortical neurons. *Eur J Neurosci.* 2001;13(7):1391-402.
- Waisbren SE, Levy HL. Agoraphobia in phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis.* 1991;14(5):755-64.
- Weglage J, Grenzebach M, Pietsch M, Feldmann R, Linnenbank R, Denecke J, Koch HG. Behavioural and emotional problems in early-treated adolescents with phenylketonuria in comparison with diabetic patients and healthy controls. *J Inherit Metab Dis.* 2000;23(5):487-96.
- Weglage J, Pietsch M, Fünders B, Koch HG, Ullrich K. Neurological findings in early treated phenylketonuria. *Acta Paediatr.* 1995;84(4):411-5.
- Wilson EH, Weninger W, Hunter CA. Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J Clin Invest.* 2010;120(5):1368-79.
- Winterbourn CC, Kettle AJ. Reactions of superoxide with myeloperoxidase and its products. *Jpn J Infect Dis.* 2004;57(5):S31-3.
- Wolswijk G, Noble M. Identification of an adult-specific glial progenitor cell. *Development.* 1989;105(2):387-400.
- Wolswijk G, Riddle PN, Noble M. Platelet derived growth factor is mitogenic for O-2A adult progenitor cell. *Glia.* 1991;4(5):495-503.
- Wong AW, Xiao J, Kemper D, Kilpatrick TJ, Murray SS. Oligodendroglial expression of TrkB independently regulates myelination and progenitor cell proliferation. *J Neurosci.* 2013;33(11):4947-57.
- Wootz H, Weber E, Korhonen L, Lindholm D. Altered distribution and levels of cathepsin D and cystatins in amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice: possible roles in motor neuron survival. *Neuroscience.* 2006;143(2):419-30.
- Xia MQ, Qin SX, Wu LJ, Mackay CR, Hyman BT. Immunohistochemical study of the beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 and their ligands in normal and Alzheimer's disease brains. *Am J Pathol.* 1998;153(1):31-7.
- Xiao J, Wong AW, Willingham MM, van den Buuse M, Kilpatrick TJ, Murray SS. Brain-derived neurotrophic factor promotes central nervous system myelination via a direct effect upon oligodendrocytes. *Neurosignals.* 2010;18(3):186-202.
- Xu YZ, Nygård M, Kristensson K, Bentivoglio M. Regulation of cytokine signaling and T-cell recruitment in the aging mouse brain in response to central inflammatory challenge. *Brain Behav Immun.* 2010;24(1):138-52.

- Yamamoto H, Gurney ME. Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*. 1990;10(11):3469-78.
- Yan Q, Radeke MJ, Matheson CR, Talvenheimo J, Welcher AA, Feinstein SC. Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol*. 1997;378(1):135-57.
- Yap YW, Whiteman M, Cheung NS. Chlorinative stress: an under appreciated mediator of neurodegeneration? *Cell Signal*. 2007;19(2):219-228.
- Yew DT, Li WP, Webb SE, Lai HW, Zhang L. Neurotransmitters, peptides, and neural cell adhesion molecules in the cortices of normal elderly humans and Alzheimer patients: a comparison. *Exp Gerontol*. 1999;34(1):117-33.
- Yu AJ, Dayan P. Acetylcholine in cortical inference. *Neural Netw*. 2002;15(4-6):719-30.
- Zhang H, Vutskits L, Calaora V, Durbec P, Kiss JZ. A role for the polysialic acid-neural cell adhesion molecule in PDGF-induced chemotaxis of oligodendrocyte precursor cells. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 1):93-103.
- Zhang Y, Gu X, Yuan X. Phenylalanine activates the mitochondria-mediated apoptosis through the RhoA/Rho-associated kinase pathway in cortical neurons. *Eur J Neurosci*. 2007;25(5):1341-8.
- Zhang Y, Zhao J, Wang J, Jiao X. Brain-derived neurotrophic factor inhibits phenylalanine-induced neuronal apoptosis by preventing RhoA pathway activation. *Neurochem Res*. 2010;35(3):480-6.
- Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000;12(2):121-7.
- Zuccato C, Cattaneo E. Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol*. 2009;5(6):311-22.

ANEXO A

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação dos níveis dos metabólitos e das atividades enzimáticas da via das quinureninas, de fatores neurotróficos, Interferon gamma e proteína C reativa em plasma de pacientes fenilcetonúricos.

Pesquisador: Patrícia Fernanda Schuck

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 25983613.1.1001.0119

Instituição Proponente: Universidade do Extremo Sul Catarinense

Patrocinador Principal: Universidade do Extremo Sul Catarinense
Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA / UFRGS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 529.013

Data da Relatoria: 01/01/2014

Apresentação do Projeto:

A presente pesquisa pretende investigar os níveis dos metabólitos e das atividades enzimáticas da via das quinureninas, de fatores neurotróficos, Interferon gamma e proteína C reativa em plasma de 60 pacientes fenilcetonúricos. Este estudo caracteriza-se como do tipo descritivo, de corte transversal, com abordagem quantitativa. Neste estudo, os indivíduos serão separados em dois grupos: I) grupo controle: indivíduos saudáveis com idade entre 5 e 30 anos ($n = 30$), provenientes do laboratório Dal Pont; II) grupo fenilcetonúria: indivíduos diagnosticados com Fenilcetonúria, com idade entre 5 e 30 anos ($n = 30$), provenientes do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar se indivíduos acometidos pela fenilcetonúria (PKU) apresentam alterações na via das quinureninas e em fatores neurotróficos, interferon gamma e proteína C reativa em plasma.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os autores a presente pesquisa não apresenta risco aos participantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa que aborda assunto relevante visto que, até o momento, pouco sabe-se sobre a

Endereço: Avenida Universitária, 1105
 Bairro: Universitário CEP: 88.805-000
 UF: SC Município: CRICIÚMA
 Telefone: (48-3431-2723 Fax: (48-3431-2750 E-mail: cep@unesc.net, cep-unesc@unesc.br

Continuação do Parecer: 529.013

fisiopatogenia do dano cerebral apresentado por pacientes afetados por fenilcetonúria. O melhor conhecimento desta fisiopatogenia proporciona a chance de se conhecer e desenvolver tratamentos mais eficazes no combate as consequências desta doença.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão adequados.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O presente projeto não apresenta pendências ou inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

CRICIUMA, 13 de Fevereiro de 2014

Assinador por:

RENAN ANTONIO CERETTA
(Coordenador)

Endereço: Avenida Universitária, 1105

Bairro: Universitário

CEP: 88.805-000

UF: SC

Município: CRICIUMA

Telefone: (48-3431-2723

Fax: (48-3431-2750

E-mail: cep@unesc.net, cep-unesc@unesc.br