

## **CAFEÍNA PREVINE A INIBIÇÃO CAUSADA PELA FENILALANINA SOBRE A PIRUVATOCINASE EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS<sup>1</sup>**

### *CAFFEINE PREVENTS THE INHIBITION CAUSED BY PHENYLALANINE ON PYRUVATE KINASE IN THE CEREBRAL CORTEX OF RATS*

**Liliane Medianeira Mayer Possani<sup>2</sup>, Itiane Diehl de Franceschi<sup>3</sup>, Guilherme Machado do Carmo<sup>2</sup>, Mariana Preussler Mott<sup>2</sup>, Nathana Jamille Mezzomo<sup>2</sup>, Adriana Maria Zago<sup>4</sup> e Virginia Cielo Rech<sup>5</sup>**

#### **RESUMO**

Fenilcetonúria clássica (PKU) é um erro inato do metabolismo dos aminoácidos, causado pela deficiência da enzima hepática fenilalanina hidroxilase, levando à hiperfenilalaninemia. Pacientes não tratados precocemente desenvolvem um quadro severo de deficiência mental. O acúmulo de fenilalanina (Phe) inibe a atividade da enzima piruvatoquinase (PK) de córtex cerebral de pacientes e de ratos, indicando um desequilíbrio do metabolismo energético cerebral característico na PKU. A doença também promove o estresse oxidativo que é relacionado à inibição da PK. A cafeína é uma substância presente em diversos alimentos e, em altas doses, pode ter ação antioxidante protegendo a célula dos danos oxidativos. Neste estudo, foi investigado se a cafeína (1  $\mu$ M) previne a inibição causada pela Phe (3 mM) sobre a atividade da PK de córtex cerebral de ratos. Foram utilizados homogeneizados de córtex cerebral de 6 ratos Wistar de 30 dias de vida. A análise estatística, realizada por Anova de 2 vias, revelou, *in vitro*, uma prevenção pela cafeína sobre a inibição da atividade da PK causada pela Phe. Piruvatocinase é uma enzima chave da glicólise, resta ser elucidado se este achado é relevante também *in vivo*. Muitos estudos relatam uma ligação entre a neurotoxicidade causada pela Phe e o desequilíbrio energético cerebral. Um dos fatores que contribui para a instauração deste quadro é a inibição da atividade da PK, que pode ser prevenida pelo uso de substâncias antioxidantes na dieta, como pode ter ocorrido neste estudo pela cafeína.

**Palavras-chave:** cérebro, fenilcetonúria, piruvatocinase, cafeína.

#### **ABSTRACT**

*The classical phenylketonuria (PKU) is an inborn error of amino acid metabolism caused by a deficiency of hepatic enzyme phenylalanine hydroxylase, which leads to hyperphenylalaninemia. Patients that are not treated early develop a severe mental disability. The accumulation of phenylalanine (Phe) inhibits the activity of the enzyme pyruvate kinase (PK) of the cerebral cortex of patients and rats, which indicates an imbalance of brain energy metabolism, which is characteristic of PKU. The disease also promotes an oxidative stress that is related to the inhibition of PK. Caffeine is a substance found in many foods, and, in high doses it may have antioxidant properties and thus protect the cell from oxidative damage. In this study, it is investigated whether*

<sup>1</sup> Trabalho Final de Graduação - TFG.

<sup>2</sup> Acadêmicos do Curso de Biomedicina - Centro Universitário Franciscano.

<sup>3</sup> Aluna do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica - UFRGS.

<sup>4</sup> Coorientadora - Centro Universitário Franciscano.

<sup>5</sup> Orientadora - Centro Universitário Franciscano. E-mail: vga.cielo@gmail.com

*caffeine (1  $\mu$ M) can prevent the inhibition caused by Phe (3 mM) on the PK activity in the cerebral cortex of rats. It was used cerebral cortex homogenates of six thirty-day-old Wistar rats. The statistical analysis performed by 2-way ANOVA revealed, in vitro, a prevention by caffeine on the inhibition of PK activity caused by Phe. Pyruvate kinase is a key enzyme of glycolysis. It is still necessary to be elucidated whether this finding is relevant in vivo as well. Many studies have reported a link between the neurotoxicity caused by Phe and cerebral energy imbalance. One of the factors that contributes to this framework is the inhibition of PK activity, which can be prevented by the use of antioxidants in the diet, as it may have occurred in this study by caffeine.*

**Keywords:** *brain, phenylketonuria, pyruvate kinase, caffeine.*

## INTRODUÇÃO

Fenilcetonúria (PKU; MIM # 261600) é um erro inato do metabolismo dos aminoácidos (EIM), de herança autossômica recessiva, caracterizada pela ausência ou deficiência na atividade da enzima hepática fenilalanina hidroxilase (PAH; EC 1.14.16.1), que catalisa a conversão de fenilalanina (Phe) em tirosina (Tyr). A deficiência da PAH eleva as concentrações de Phe e de seus metabólitos - fenilpiruvato, fenilacetato - no sangue e tecidos dos pacientes, sendo também excretados na urina (SCRIVER; KAUFMAN, 2001).

Os sintomas surgem por volta do primeiro mês de vida, à medida que a criança entra em contato com alimentos que contenham Phe, como o leite materno. Sem restrição dietética de Phe, a maioria das crianças desenvolve um severo quadro de deficiência mental (MITCHELL; TRAKADIS; SCRIVER, 2011). Acredita-se que a Phe seja a principal substância neurotóxica na doença, já que ela compete em maior quantidade com outros aminoácidos pelo transporte para dentro da célula nervosa, causando desequilíbrio na concentração intracelular dos aminoácidos, afetando a síntese de neurotransmissores e de mielina (GROOT et al., 2010).

Estudos em córtex cerebral de ratos Wistar demonstraram que os metabólitos acumulados na PKU alteram as atividades das enzimas piruvatocinase (FEKSA et al., 2002), creatinacinaase (COSTABEBER et al., 2003), succinato desidrogenase e complexo I da cadeia de transporte de elétrons (RECH et al., 2002) e promovem o estresse oxidativo (HAGEN et al., 2002), indicando um desequilíbrio do metabolismo energético cerebral e indução ao estresse oxidativo, característicos na PKU.

A piruvatocinase (PK; EC 2.7.1.40) é uma das enzimas regulatórias da via glicolítica e catalisa a conversão do fosfoenolpiruvato (PEP) e adenosina difosfato (ADP) em piruvato e adenosina trifosfato (ATP). Ela pode ser considerada uma enzima-chave para todo o metabolismo celular, não somente para a via glicolítica porque o piruvato - produto da reação catalisada pela PK - está envolvido em várias vias metabólicas (MATTEVI et al., 1996).

A cafeína (1, 3, 7 - trimetilxantina) é o ingrediente ativo do café e também está presente em chás, refrigerantes, chocolate (TEMPLE, 2009; CHANDRA et al., 2011), chimarrão (VIEIRA et al., 2010) e até mesmo, em alguns medicamentos analgésicos (FRARY et al., 2005). Dentre os efeitos

fisiológicos provocados pela cafeína no organismo podemos citar: vasoconstrição coronariana e cerebral, relaxamento da musculatura lisa e redução da sensibilidade à insulina (SEIFERT et al., 2011). Em altas concentrações ela pode, “*per se*”, ter ação antioxidante “sequestrando” radicais livres e desta maneira, proteger a célula dos danos oxidativos (TEMPLE, 2009; ECHEVERRI et al., 2010).

Considerando que pacientes PKU apresentam retardo no desenvolvimento e deficiência intelectual (MORAES et al., 2010) e que o uso de cafeína reduz o déficit de memória em doenças neurodegenerativas como o Alzheimer (FERRÉ, 2008), aumenta a disponibilidade energética, melhora o desempenho cognitivo e aumenta a capacidade de concentração (GLADE, 2010), no presente trabalho foi avaliada a influência *in vitro* da cafeína sobre a atividade da enzima PK, com e sem Phe no córtex cerebral de ratos jovens.

## METODOLOGIA

*Animais e Reagentes*: foram utilizados 6 ratos machos *Wistar* com 30 dias de vida, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Eles foram mantidos no Biotério do Centro Universitário Franciscano, em salas climatizadas ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1\text{C}$ ), com ciclos de 12h claro-escuro, água e ração *ad libitum*. Os Princípios de Cuidados com Animais de Laboratório (NIH publicação N°. 80-23, revisado em 1996) foram seguidos em todos os experimentos e o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro Universitário Franciscano (CEUA/UNIFRA), Santa Maria, RS, Brasil, sob o número 0131/2012.

Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados, bem como o sofrimento deles. Todos os reagentes químicos foram adquiridos da Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

*Preparo do Tecido Cerebral*: os ratos foram mortos sem anestesia por decapitação. O cérebro foi rapidamente removido e dissecado sobre uma placa de Petry mantida resfriada. Após a separação, o córtex cerebral foi homogeneizado 1:10 (m/v) em tampão SET (0,32 M sacarose; 1 mM EGTA; 10 mM Tris-HCl; pH 7,4), em homogeneizador de vidro Potter-Elvehjem. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000g por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  em centrífuga Novatecnica refrigerada. O sedimento foi descartado e o sobrenadante utilizado para determinação da concentração protéica e da atividade da PK.

*Determinação Proteica*: o conteúdo proteico das amostras foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951) usando albumina bovina sérica como padrão.

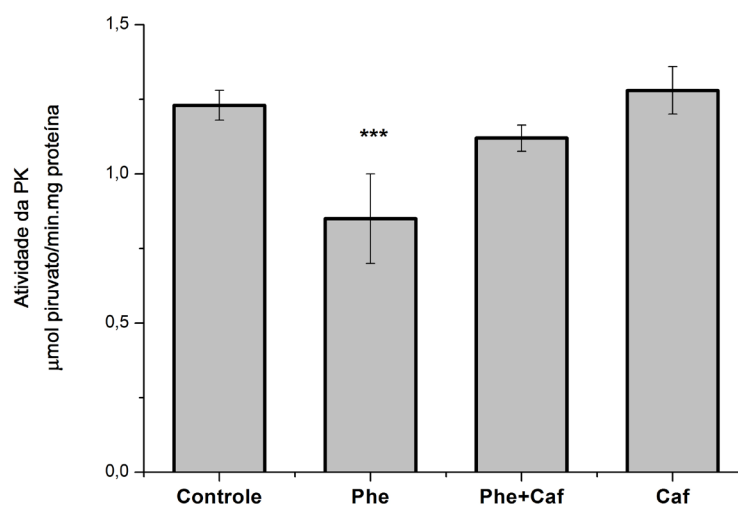
*Atividade Enzimática*: a atividade da PK foi medida conforme Leong et al. (1981). O meio de incubação contém 0,1 M de tampão Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,16 mM NADH; 75 mM KCl; 5,0 mM ADP; 7 unidades de L-lactato desidrogenase; 0,1% (v/v) de Triton X-100; e 10mL de sobrenadante livre de mitocôndrias num volume final de 0,5mL. A reação foi iniciada pela adição de 1,0 mM de fosfoenolpiruvato. O experimento foi executado em duplicata a  $37^{\circ}\text{C}$ . Quando presentes no meio de incubação, a concentração final de Phe foi 3 mM e de cafeína foi de 1 mM. A Phe e a

cafeína nas concentrações citadas não alteraram a leitura do branco da amostra. Os resultados foram expressos em mmol de piruvato formado por min por mg de proteína.

*Análise Estatística:* os valores foram considerados significantes quando  $p < 0,05$ . Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão e analisados por ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey quando os valores de F foram significativos. Todos os dados foram analisados pelo *Statistical Package for Social Sciences - SPSS*.

## RESULTADOS

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Na figura 1, pode-se observar que a administração de 3 mM de Phe reduziu significativamente a atividade da PK (grupo Phe -  $0,85 \pm 0,15$ ), enquanto que a administração de 1mM de cafeína (grupo Caf- $1,28 \pm 0,08$ ) e a associação de Phe e cafeína (grupo Phe+Caf- $1,12 \pm 0,04$ ), nas mesmas doses, não alteraram a atividade da PK quando comparados ao grupo Controle ( $1,23 \pm 0,05$ ). A interação significativa entre fenilalanina e cafeína (Phe+Caf) por ANOVA de 2 vias ( $F(1,17) = 5,25$ ;  $p < 0,01$ ) indica que a cafeína preveniu a inibição causada pela Phe sobre a atividade da PK. Estudos cinéticos serão necessários para esclarecer o mecanismo pelo qual a cafeína previne a inibição da PK causada pela Phe.



**Figura 1** - Efeito *in vitro* da cafeína (Caf) sobre a atividade da PK de córtex cerebral de ratos com e sem a presença de Phe. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão para 6 experimentos independentes executados em duplicata. \*\*\* $p < 0,001$  comparado aos demais grupos (teste de Tukey).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da hiperfenilalaninemia em pacientes PKU não tratados normalmente levar a um severo comprometimento das funções cerebrais, e um dos fatores que corrobora para o desequilíbrio energético cerebral é a inibição competitiva da Phe com os substratos da enzima PK (FEKSA et al., 2003), os mecanismos de danos cerebrais nesta desordem parecem ser múltiplos e ainda não compreendidos.

Além disso, tem sido demonstrado que a Phe, em concentrações similares aquelas encontradas em pacientes PKU, aumenta *in vitro* a lipoperoxidação e o dano oxidativo a proteínas e diminui as defesas antioxidantes cerebrais em ratos. Essas alterações também podem ser observadas em pacientes PKU (FERNANDES et al., 2010). Sitta et al. (2011) relatam que a suplementação de uma mistura contendo L-carnitina e selênio a pacientes PKU reduziu danos oxidativos a proteína e lipídeos no sangue dos mesmos. Estes dados sugerem que antioxidantes adicionados à dieta podem alterar o quadro de estresse oxidativo que ocorre nestes pacientes.

No presente estudo *in vitro*, foi investigado o efeito da cafeína sobre a atividade da PK de córtex cerebral de ratos jovens com e sem a presença de Phe. Este aminoácido, administrado em uma dose próxima à encontrada em fenilcetonúricos (3 mM), inibiu a atividade da PK e a cafeína, na dose de 1 mM, preveniu esta inibição. Também pode ser observado que a cafeína *per se* não afeta a atividade da PK do córtex cerebral. Outros autores relataram que a adição de cafeína em culturas primárias de células do músculo esquelético (LAWRENCE; SALSGIVER, 1984) e de culturas pré-crescidas de *Aspergillus parasiticus* (BUCHANAN; LEWIS, 1984) não afetou a atividade da PK, apesar de serem isoformas diferentes.

A prevenção da inibição causada pela Phe na atividade da PK pela cafeína pode ter ocorrido porque a cafeína, em altas concentrações, pode ter ação antioxidante, “sequestrando” os radicais livres (TEMPLE, 2009; ECHEVERRI et al., 2010) presentes na PKU. Este experimento indica que se essa prevenção ocorrer em pacientes PKU, o uso da cafeína como adjuvante terapêutico talvez possa ajudar a prevenir o comprometimento da função cognitiva relatada nos pacientes, porém mais estudos serão necessários para validar esta hipótese.

## REFERÊNCIAS

- BUCHANAN, R. L; LEWIS, D.F. Caffeine inhibition of aflatoxin synthesis: probable site of action. **Applied and environmental microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1216-1220, 1984.
- CHANDRA, P.; GAUR, A.; VARMA, S. Effects of caffeine on the intraocular pressure in patients with primary open angle glaucoma. **Clinical Ophthalmology**, v. 5, p. 1623–1629, 2011.

- COSTABEBER, E. et al. Hyperphenylalaninemia reduces creatine kinase activity in the cerebral cortex of rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 21, n. 2, p. 111-116, 2003.
- ECHEVERRI, D. et al. Caffeine's Vascular Mechanisms of Action. **International Journal of Vascular Medicine**, v. 2010, p. 1-10. 2010.
- FEKSA, L. R. et al. Alanine prevents the reduction of pyruvate kinase activity in brain cortex of rats subjected to chemically induced hyperphenylalaninemia. **Neurochemical Research**, v. 27, n. 9, p. 947-952, 2002.
- FEKSA, L. R. et al. Characterization of the inhibition of pyruvate kinase caused by phenylalanine and phenylpyruvate in rat brain cortex. **Brain Research**, v. 968, n. 2, p. 199-205, 2003.
- FERNANDES, C. G. et al. Experimental evidence that phenylalanine provokes oxidative stress in hippocampus and cerebral cortex of developing rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 30, n. 2, p.371-326, 2010.
- FERRÉ, S. La cafeína en la enfermedad de Parkinson. **Medicina Clínica**, v. 131, n. 18 p. 710-715, 2008.
- FRARY, C. D.; JOHNSON, R. K.; WANG, M. Q. Food sources and intakes of caffeine in the diets of persons in the United States. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 105, n. 1, p. 110-113, 2005.
- GLADE, M. J. Caffeine-Not just a stimulant. **Nutrition**, v. 26, n. 10, p. 932-938, 2010.
- GROOT, M. J. de et al. Pathogenesis of cognitive dysfunction in phenylketonuria: Review of hypotheses. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 99, n. 1, p. 86-89, 2010.
- HAGEN, M. E. K. et al. Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1586, n. 3, p. 344-352, 2002.
- LAWRENCE, J. C. Jr; SALSGIVER, W. J. Evidence that levels of malate dehydrogenase and fumarase are increased by cAMP in rat myotubes. **American Journal of physiology**, v. 247, n. 1, p. 33-38, 1984.
- LEONG, S. F. et al. Energy-metabolising enzymes in brain regions of adult and aging rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1548-1556, 1981.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MATTEVI, A.; BOLOGNESI, M.; VALENTINI, G. The allosteric regulation of pyruvate kinase. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 389, n. 1, p. 15-19, 1996.

MITCHELL, J. J.; TRAKADIS, Y. J.; SCRIVER, C. R. Phenylalanine hydroxylase deficiency. **Genetics in Medicine: official journal of the American College of Medical Genetics**, v. 13, p. 697-707, 2011.

MORAES, T. B. et al. Lipoic acid prevents oxidative stress in vitro and in vivo by an acute hyperphenylalaninemia chemically-induced in rat brain. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 292, p. 89-95, 2010.

RECH, V. C. et al. Inhibition of the mitochondrial respiratory chain by phenylalanine in rat cerebral cortex. **Neurochemical Research**, v. 27, n. 5, p. 353-357, 2002.

SCRIVER, C. R.; KAUFMAN, S. 8<sup>a</sup> ed. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: SCRIVER, C. R. et al. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases**, New York: McGraw-Hill, 2001.

SEIFERT, S. M. et al. Health effects of energy drinks on children, adolescents, and young adults. **Pediatrics**, v. 127, n. 3, p. 511-528, 2011.

SITTA, A. et al. Evidence that L-carnitine and selenium supplementation reduces oxidative stress in phenylketonuric patients. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 31, n. 3, p. 429-436, 2011.

TEMPLE, J. L. Caffeine use in children: what we know, what we have left to learn, and why we should worry. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 6, p. 793-806, 2009.

VIEIRA, M. A. et al. Phenolic Acids and Methylxanthines Composition and Antioxidant Properties of Mate (*Ilex paraguariensis*) Residue. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 3, p. 280-285, 2010.



