

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”

UNIGRANRIO

LUÍSA NOGUEIRA CASCARDO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE MICROGLIA PARA
INVESTIGAÇÃO DA FISIOPATOLOGIA DA FENILCETONÚRIA**

RIO DE JANEIRO

2025

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”

UNIGRANRIO

LUÍSA NOGUEIRA CASCARDO DA SILVA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

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

Coorientadora: Dr^a. Belisa Parmeggiani

RIO DE JANEIRO

2025

LUÍSA NOGUEIRA CASCARDO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE MICROGLIA PARA
INVESTIGAÇÃO DA FISIOPATOLOGIA DA FENILCETONÚRIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio “Prof. José de
Souza Herdy”, como requisito parcial para a
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

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

Coorientadora: Dr^a. Belisa Parmeggiani

Aprovada em:

Rio de Janeiro, _____ de _____ de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Fernanda Schuck (orientadora)

Dr^ª. Belisa dos Santos Parmeggiani (coorientadora)

Me. Clara Fernandes Carvalho

Prof^ª. Dr^ª Viveca Antônia Giongo Galvão da Silva

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4a-OH-BH₂ – 4a-Hidroxi-di-hidrobiopterina
ANOVA – Análise de variância de uma via (do inglês *analysis of variance*)
BHE – Barreira hematoencefálica
BH₄ – Tetra-hidrobiopterina
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol (do inglês *4',6-diamidino-2-phenylindole*)
DMEM – Meio Eagle Modificado de Dulbecco (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
DTNB – Ácido ditionitrobenzoico
EO – Estresse oxidativo
ERO – Espécies reativas do oxigênio
Iba1 – Molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1 (do inglês *ionized calcium-binding adaptor molecule 1*)
IL-1 β – Interleucina 1 beta
IL-6 – Interleucina 6
LAT1 – Transportador de aminoácidos grandes neutros do tipo L1
LAT2 – Transportador de aminoácidos grandes neutros do tipo L2
LAT3 – Transportador de aminoácidos grandes neutros do tipo L3
LAT4 – Transportador de aminoácidos grandes neutros do tipo L4
LDH – Lactato desidrogenase (do inglês *Lactate dehydrogenase*)
LDHe – LDH extracelular
LDHi – LDH intracelular
nTPM – Transcritos codificadores de proteína por milhão normalizados
OPC – Células precursoras de oligodendrócitos
PAH – Fenilalanina hidroxilase
PBS – Solução salina tamponada com fosfato
Phe – L-Fenilalanina
PKU – Fenilcetonúria
RNA_m – RNA mensageiro
RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa
SNC – Sistema nervoso central
T3 – Tri-iodotironina
T4 – Tiroxina
TNB – Ácido 2-nitro-5-mercaptopbenzoico
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
Trp – Tryptofano
Tyr – L-Tirosina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da L-fenilalanina (Phe).....	11
Figura 2 - Reação catalisada pela fenilalanina hidroxilase (PAH).....	12
Figura 3 - Transporte e acúmulo de Phe no sistema nervoso central (SNC).....	14
Figura 4 - Expressão do gene <i>LAT1</i> em diferentes tipos celulares do sistema nervoso central e hepatócitos de humanos.....	23
Figura 5 - Expressão dos genes <i>LAT2</i> , <i>LAT3</i> e <i>LAT4</i> em diferentes tipos celulares do sistema nervoso central e hepatócitos de humanos.....	24
Figura 6 - Expressão do gene <i>PAH</i> em diferentes tipos celulares do sistema nervoso central e hepatócitos de humanos.	25
Figura 7 - Níveis relativos de RNAm dos genes <i>Lat1</i> e <i>Pah</i> em células BV-2 determinados por RT-PCR.....	25
Figura 8 - Análise qualitativa da morfologia de células BV-2 (controle) e H ₂ O ₂ 0,1 mM (controle positivo) após 48 horas de incubação.....	26
Figura 9 - Imunomarcagem da proteína Iba1 em células BV-2 incubadas com meio de cultura por 48h.....	26
Figura 10 - Análise qualitativa da morfologia e da proliferação celular de células BV-2 incubadas com fenilalanina (Phe) ou H ₂ O ₂ 0,1 mM 48h por 24h, 48h e 72h.....	28
Figura 11 -Atividade da lactato desidrogenase (LDH) em células BV-2 incubadas com diferentes concentrações de fenilalanina (Phe) ou com H ₂ O ₂ 0,1 mM.....	29
Figura 12 - Efeito <i>in vitro</i> de diferentes concentrações de fenilalanina (Phe) sobre o conteúdo de grupos sulfidríla em células BV-2.....	29
Figura 13 - Uso de células BV-2 como modelo experimental para estudo dos efeitos da fenilalanina (Phe).....	34

RESUMO

A fenilcetonúria (PKU) é um erro inato do metabolismo da fenilalanina (Phe) causado pela deficiência da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), levando ao acúmulo de Phe nos líquidos e tecidos de pacientes. Os principais sinais e sintomas da PKU são neurológicos, e acredita-se que sejam resultado de efeitos neurotóxicos da Phe. Considerando-se que os mecanismos da neurotoxicidade da Phe ainda não estejam bem elucidados, e que estudos sugerem o envolvimento da microglia na fisiopatologia da PKU, o presente trabalho buscou caracterizar um modelo experimental *in vitro* para investigação dos efeitos da Phe sobre células da microglia utilizando células BV-2. Inicialmente, foram coletadas de bancos de dados informações sobre a expressão dos genes que codificam a enzima PAH e os transportadores de aminoácidos LAT (1-4) em células humanas. Os dados coletados mostraram que as células da microglia humana não expressam *PAH* e, dentre as células humanas investigadas, a microglia é a que apresenta maior expressão do gene *LAT1*, que codifica o principal transportador de Phe. Análises por RT-PCR demonstraram que, da mesma forma que a microglia humana, as células BV-2 expressam *Lat1*, mas não expressam *Pah*, indicando que a Phe pode ser transportada para dentro dessas células sem ser metabolizada pela enzima PAH. Análises por imunofluorescência confirmaram que as células BV-2 apresentam marcadores clássicos de microglia (Iba-1). Células BV-2 foram, então, incubadas na ausência (controle) ou presença de H₂O₂ 0,1 mM ou Phe (1, 2,5 ou 5 mM) por 48h. Imagens de microscopia de campo claro mostraram que a incubação com H₂O₂ 0,1 mM ou Phe 5 mM induziram alterações morfológicas evidentes nas células BV2 e promoveram um aumento na liberação de LDH em comparação ao grupo controle, indicando uma redução da viabilidade celular. Além disso, as concentrações de Phe 2,5 mM e 5 mM inibiram a atividade total da enzima LDH. Por fim, avaliou-se o efeito de Phe sobre o conteúdo de grupos sulfidríla, indicador do estado redox celular, e se observou que Phe 5 mM e H₂O₂ 0,1 mM diminuíram o conteúdo desse marcador. Em conjunto, os resultados sugerem que as células BV-2 podem ser utilizadas para o estudo da participação da microglia na fisiopatologia da PKU.

Palavras-chave: Células BV-2; Fenilcetonúria; Microglia; Modelo Experimental; Sistema Nervoso Central.

ABSTRACT

Phenylketonuria (PKU) is an inborn error of phenylalanine (Phe) metabolism caused by a deficiency of the enzyme phenylalanine hydroxylase (PAH), leading to the accumulation of Phe in the fluids and tissues of patients. The main signs and symptoms of PKU are neurological, and are believed to result from the neurotoxic effects of Phe. Considering that the mechanisms of Phe neurotoxicity are not yet well elucidated, and that studies suggest the involvement of microglia in the pathophysiology of PKU, this work sought to characterize an *in vitro* experimental model to investigate the effects of Phe on microglia cells using BV-2 cells. Initially, information on the expression of genes encoding the PAH enzyme and the LAT (1-4) amino acid transporters in human cells was collected from databases. The collected data showed that human microglia cells do not express *PAH* and, among the human cells investigated, microglia is the one that presents the highest expression of the *LAT1* gene, which encodes the main Phe transporter. RT-PCR analyses demonstrated that, similarly to human microglia, BV-2 cells express *Lat1* but do not express *Pah*, indicating that Phe can be transported into these cells without being metabolized by PAH. Immunofluorescence analyses confirmed that BV-2 cells exhibit classic microglia markers (Iba-1). BV-2 cells were then incubated in the absence (control) or presence of 0.1 mM H₂O₂ or Phe (1, 2.5, or 5 mM) for 48 h. Bright-field microscopy images showed that incubation with 0.1 mM H₂O₂ or 5 mM Phe induced evident morphological changes in BV2 cells and promoted an increase in LDH release compared to the control group, indicating a reduction in cell viability. Furthermore, Phe concentrations of 2.5 mM and 5 mM inhibited the total activity of the LDH enzyme. Finally, the effect of Phe on the content of sulfhydryl groups, an indicator of cellular redox status, was evaluated, and it was observed that 5 mM Phe and 0.1 mM H₂O₂ decreased the content of this marker. Taken together, the results suggest that BV-2 cells can be used to study the role of microglia in the pathophysiology of PKU.

Keywords: BV-2 cells; Central Nervous System; Experimental Model; Microglia; phenylalanine; phenylketonuria

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	FENILALANINA.....	11
1.2	FENILCETONÚRIA.....	12
1.2.1	FISIOPATOLOGIA.....	13
1.2.2	MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDAR A FISIOPATOLOGIA DA PKU.....	15
1.3	MICROGLIA.....	16
1.3.1	CÉLULAS BV-2.....	17
2	OBJETIVO.....	18
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3	METODOLOGIA.....	19
3.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	19
3.2	COLETA DE INFORMAÇÕES DO BANCO DE DADOS.....	19
3.3	CULTURA DE CÉLULAS BV-2.....	19
3.4	IMUNOCITOQUÍMICA.....	20
3.5	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES <i>Lat1</i> E <i>Pah</i> em CÉLULAS BV-2.....	20
3.6	AVALIAÇÃO DO pH NO MEIO DE CULTURA.....	21
3.7	MICROSCOPIA EM CAMPO CLARO.....	21
3.8	ATIVIDADE DA ENZIMA LACTATO DESIDROGENASE (LDH).....	22
3.9	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE GRUPOS SULFIDRILA.....	22
3.10	DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	22
3.11	FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	22
4	RESULTADOS	23
5	DISCUSSÃO	30

6 CONCLUSÃO.....	34
7 PERSPECTIVAS.....	35
8 REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

1.1 FENILALANINA

A L-fenilalanina (Phe) é um aminoácido aromático com fórmula molecular $C_9H_{11}NO_2$, que possui um radical fenila ligado a um grupo metileno em sua cadeia lateral (Figura 1) (O'Brien DM, 2005). A Phe é um aminoácido essencial que corresponde a aproximadamente 3,9% dos resíduos de aminoácidos encontrados na estrutura das proteínas (Bartlett GJ et al., 2002). Suas principais fontes são dieta e proteólise (Kindt E et al., 1980). A Phe exerce diferentes papéis metabólicos, participando da síntese proteica e sendo precursora de L-tirosina (Tyr) e de neurotransmissores, especialmente as catecolaminas (Citron BA et al., 1992).

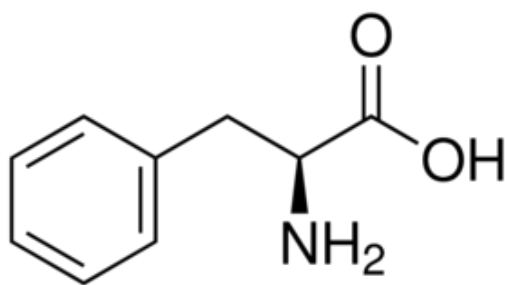


Figura 1 - Estrutura química da L-fenilalanina.

Fonte: *Wikimedia Commons*, Licenciado sob CC BY-SA 3.0, 2019.

Aproximadamente 75% da Phe são metabolizados pela enzima fenilalanina-4-hidroxilase (PAH; EC #1.14.16.1), a qual hidroxila seu anel aromático, sintetizando Tyr (Flydal MI, 2013). Essa reação utiliza como cofator a tetra-hidrobiopterina (BH_4) e requer oxigênio molecular e íon ferroso (Figura 2) (Anikster Y et al., 2017). O principal local de expressão da PAH é o fígado, embora pequenas quantidades sejam encontradas nos rins e no pâncreas (Güttler F, 1997; Lichter-Konecki U et al., 1999).

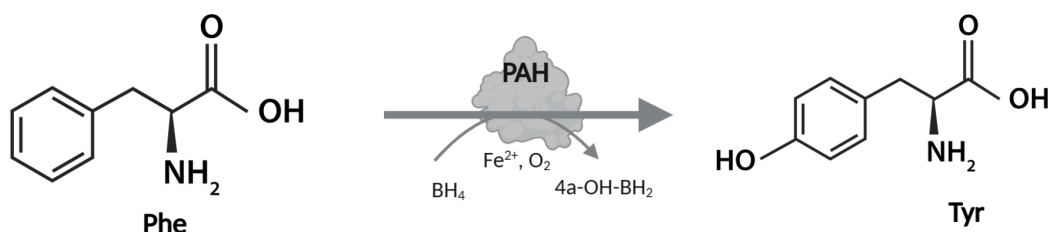


Figura 2 - Reação catalisada pela fenilalanina hidroxilase (PAH).

4a-OH-BH₂= 4a-hidroxidi-hidrobióptero; BH₄ = tetra-hidrobióptero; PAH= fenilalanina hidroxilase;
Phe= fenilalanina; Tyr= tirosina.

Fonte: A autora. Figura criada com Biorender.

A Tyr, cuja síntese endógena é exclusivamente dependente da reação da PAH, é considerada um aminoácido semiessencial (Arias-Barrau E et al., 2004). Além de participar da síntese proteica, a Tyr atua como precursora na produção de neurotransmissores, como dopamina, norepinefrina e epinefrina, assim como de hormônios, tais como tiroxina (T₄) e tri-iodotironina (T₃), e do pigmento melanina (Fernstrom JD, 2007). Embora não seja substrato energético *per se*, a Tyr também é precursora de fumarilacetoacetato, um intermediário que pode dar origem a acetoacetato e fumarato, compostos ceto e glicogênico, respectivamente (Singh RH et al., 2014). Assim, a síntese de Tyr pela reação da PAH é vital para o organismo por diferentes motivos.

Existem vias alternativas de catabolismo da Phe, embora possuam uma relevância menor em relação à sua hidroxilação em Tyr. Um exemplo é a transaminação da Phe pela enzima fenilalanina (histidina) transaminase (EC #2.6.1.58), formando ácidos fenilpirúvico, fenil-láctico e fenilacético, que se torna mais relevante quando há um aumento drástico das concentrações de Phe na célula (Scriver CR, 1973).

1.2 FENILCETONÚRIA

A fenilcetonúria (PKU; OMIM #261600) é um erro inato do metabolismo da Phe com padrão de herança autossômico recessivo (Williams RA, 2008). A PKU é causada pela deficiência total ou parcial da atividade da PAH (Al Hafid N, 2015), resultando no acúmulo de Phe nos tecidos e líquidos biológicos de pacientes. Além disso, há redução das concentrações de Tyr e aumento da produção de fenilcetonas, que são excretadas pela urina (Van Spronsen F et al., 2021). Os principais sinais e sintomas apresentados pelos pacientes

incluem deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento, hipo/desmielinização, epilepsia, microcefalia e hipopigmentação da pele, do cabelo e dos olhos (Cappelletti S et al., 2013).

A epidemiologia da PKU pode variar de acordo com as etnias e regiões geográficas. Em nível mundial, estima-se uma incidência de 1:24.000 nascidos vivos (Hillert A et al., 2020). No Brasil, a prevalência estimada é de 1:15.000 nascidos vivos (Brasil, MS/Portaria n.º 12, 2019). A triagem da PKU pode ser realizada por meio da dosagem dos níveis de Phe em amostras de sangue seco coletadas em papel filtro nos primeiros dias de vida na triagem neonatal (o chamado teste do pezinho) (Brasil, MS/Portaria n.º 12, 2019). O diagnóstico confirmatório se dá pela quantificação dos níveis de Phe e Tyr em amostras de sangue, bem como por análises moleculares (Tylek-Lemańska D, 2002).

Atualmente, o tratamento disponível para a PKU se baseia em uma dieta restrita em Phe por toda a vida (Sumaily KM, 2017), com suplemento de aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais (Knox WE, 1960). O tratamento precoce diminui consideravelmente os riscos de atrasos no neurodesenvolvimento dos pacientes (Smith I, 1990). No entanto, muitos pacientes enfrentam dificuldades para seguir essa restrição alimentar, por se tratar de uma dieta rigorosa. Além disso, mesmo pacientes sob tratamento podem apresentar danos neurológicos irreversíveis (González MJ et al., 2011). Dessa forma, o diagnóstico precoce e o tratamento adequado são essenciais para evitar a elevação exacerbada dos níveis de Phe em pacientes e, consequentemente, o dano neurológico (Medford E, 2018).

1.2.1 FISIOPATOLOGIA

A fisiopatologia da PKU ainda não está completamente elucidada, especialmente no que se refere aos mecanismos responsáveis pelo comprometimento do sistema nervoso central (SNC) (Rovelli V, 2023).

Diversos transportadores de aminoácidos do tipo L (LAT), como LAT1 (SLC7A5), LAT2 (SLC7A8), LAT3 (SLC43A1) e LAT4 (SLC43A2), são conhecidos por mediar o transporte de Phe e outros aminoácidos para dentro e/ou para fora das células. O LAT1, um transportador de aminoácidos grandes e neutros que possui alta afinidade pela Phe (K_M 5-50 μM), é o principal transportador de Phe pela barreira hematoencefálica e das células do SNC (Meier C et al., 2002), incluindo a microglia. Esse transportador possui uma afinidade maior pelo transporte de Phe para dentro da célula do que para a fora, permitindo uma maior retenção intracelular da Phe e, consequentemente, impedindo a entrada de outros

aminoácidos pelo mesmo transportador (Meier C et al., 2002). Nesse cenário, o transporte de Tyr e o triptofano pelo LAT1 é inibido por competição quando há um aumento na concentração de Phe (por exemplo, no caso da PKU), o que pode resultar em acúmulo deste aminoácido em detrimento daqueles no SNC (Borges BL et al., 2022) (Figura 3) .

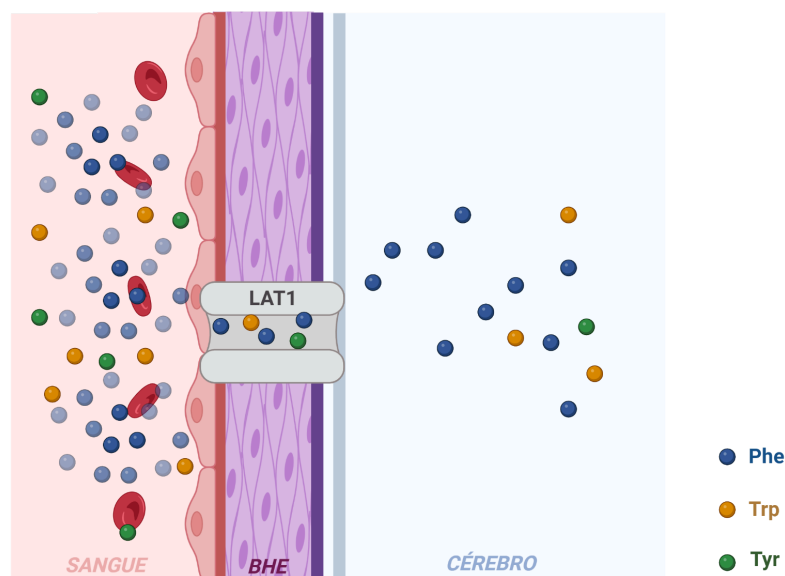


Figura 3 - Transporte e acúmulo de Phe no sistema nervoso central.

BHE= barreira hematoencefálica; Phe= fenilalanina; Trp= triptofano; Tyr= tirosina.

Fonte: A autora. Criada com Biorender.

Além dessa alteração nas concentrações de aminoácidos, foram descritos alguns mecanismos de toxicidade da Phe. Estudos em modelos experimentais mostraram que altas concentrações de Phe comprometem a síntese de proteínas (Surtees R et al., 2000), alteram o metabolismo energético (Pietz J et al., 2003; Dimer NW et al., 2018), induzem estresse oxidativo (EO) (Dobrowolski SF et al., 2022), causam dano ao DNA (Simon KR et al., 2013), comprometem a homeostase do cálcio (Yu YG, 2007), reduzem a biossíntese de neurotransmissores (Winn SR et al., 2018) e diminuem a viabilidade celular de astrócitos e neurônios (Preissler T et al., 2016). Em pacientes com PKU, foram observadas alterações nos níveis de neurotransmissores, comprometimento na biossíntese de colesterol e indução de estresse oxidativo em análises de amostras de fluidos biológicos (Campistol Plana J, 2019; Deon M et al., 2015; Faverzani JL et al., 2023; Faverzani JL et al., 2025; Van der Goot E et al., 2019; Çiçek Ç, 2024; Kim J et al., 2022).

Recentemente, foi sugerido um possível papel da inflamação na fisiopatologia da PKU. Estudos observaram aumento de citocinas pró-inflamatórias em amostras de plasma de

pacientes fenilcetonúricos (Deon M et al., 2015; Faverzani JL et al., 2023) e em cérebro de ratos submetidos à hiperfenilalaninemia crônica (Çiçek Ç, 2024; Faverzani JL et al., 2025). Em um estudo utilizando fatias organotípicas de cerebelo, observou-se que a exposição prolongada a altas concentrações de Phe aumenta o número de células microgliais e induz reatividade microglial, resultando em dano significativo à mielina (Thau-Zuchman O et al., 2022). Além disso, Faverzani e colaboradores sugeriram uma possível relação entre o aumento de citocinas pró-inflamatórias e o desequilíbrio redox em estruturas cerebrais de ratos submetidos a um modelo experimental de hiperfenilalaninemia, colaborando para a neuroinflamação (Faverzani JL et al., 2025).

1.2.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE PKU

Modelos experimentais animais são amplamente utilizados para o estudo de doenças humanas, especialmente devido à sua capacidade de reproduzir características fundamentais da doença, permitindo a indução de cenários experimentais semelhantes aos observados em humanos (Bobrova NA et al., 2025). Desta forma, alguns modelos experimentais têm sido utilizados para a compreensão da fisiopatologia da PKU.

Latão e seus colaboradores, em 1982, propuseram um modelo dietético no qual foi administrada uma dieta rica em Phe, suplementada com 3% de Phe e 0,5% de α -metilfenilalanina (conhecido inibidor da PAH) a ratas grávidas. Esse estudo permitiu avaliar diversos parâmetros nos fetos, como o peso cerebral, as concentrações de diferentes aminoácidos e aspectos relacionados ao metabolismo da serotonina (Brass et al., 1982). Estudos de menor complexidade utilizaram homogeneizados de estruturas cerebrais de ratos sem exposição prévia à Phe para investigar os efeitos *in vitro* da Phe, permitindo avaliar respostas específicas a concentrações variadas do aminoácido (Fernandes GC et al., 2010).

Um modelo *in vivo* amplamente utilizado para estudo da PKU se baseia na indução química da doença pela administração de *p*-clorofenilalanina (inibidor da PAH) concomitantemente com a Phe. Esse modelo foi utilizado com abordagens agudas e/ou crônicas destinadas ao entendimento dos efeitos do acúmulo de Phe especialmente sobre o SNC (Simon et al., 2013; Dienel et al., 2016; Dimer et al., 2018).

Avanços importantes no estudo da fisiopatologia da PKU ocorreram com o desenvolvimento de modelos genéticos de PKU. O gene *Pah* foi modificado para apresentar redução ou ausência da atividade da PAH em camundongos, permitindo simular de forma consistente o acúmulo de Phe na PKU (McDonald JD et al., 1990). Harding e colaboradores

desenvolveram um vetor rAAV2/8 hepato-específico expressando o cDNA de *Pah* de camundongos, com o objetivo de restaurar a atividade enzimática e normalizar os níveis de Phe em camundongos *Pah^{enu2}* (Harding CO et al., 2006). Já em 2020, estudos envolvendo porcos modificados pela técnica CRISPR/Cas9 buscaram reproduzir com maior fidelidade os fenótipos neurocognitivos observados em humanos, possibilitando maior compreensão da neuropatologia associada à doença (Koppes et al., 2020).

Para compreender a participação de células específicas do SNC na fisiopatologia da PKU, modelos celulares passaram a ganhar destaque. Estudos em culturas de astrócitos e neurônios, tanto em linhagens celulares quanto em culturas primárias, investigaram aspectos de proliferação e viabilidade celular quando incubadas com Phe (Oberdoerster J et al., 2000). Esses mesmos modelos foram utilizados para a avaliação de parâmetros de estresse oxidativo e do efeito de compostos neuroprotetores, como melatonina, vitamina E e vitamina C, contra as alterações redox observadas na presença de Phe (Martinez-Cruz F et al., 2002; Preissler T et al., 2016). Também foram utilizadas culturas organotípicas cerebelares para avaliar processos de desmielinização e reatividade microglial na presença de altas concentrações de Phe (Thau-Zuchman O et al., 2022).

Entretanto, até o momento não se tem estudos avaliando os efeitos da Phe diretamente sobre a microglia. Neste cenário, torna-se imperativo caracterizar um modelo experimental para compreender o papel da microglia nos sinais e sintomas neurológicos apresentados por pacientes fenilcetonúricos.

1.3 MICROGLIA

A microglia é considerada a principal célula do sistema imune residente do cérebro, originando-se de precursores eritromieloides no saco vitelino durante o desenvolvimento embrionário (Kaur C, 2001). Antes da formação da BHE, esses precursores migram para o SNC, onde se diferenciam em microglia e passam a exercer suas funções (Hattori Y, 2023). As células da microglia desempenham diferentes funções, participando da regulação do desenvolvimento cerebral, da manutenção das redes neuronais, do reparo de lesões e da fagocitose de células mortas, proteínas disfuncionais e detritos celulares (Fumagalli L et al., 2025).

A microglia pode atuar na defesa contra agentes patógenos, sinais químicos/metabólicos alterados e moléculas de dano que comprometem a homeostase cerebral, sendo consideradas sensores imunes do cérebro (Colonna M, 2017). Estudos

recentes, especialmente no contexto de doenças neurodegenerativas, têm demonstrado que a microglia apresenta uma resposta complexa quando reativa, processando e reagindo dinamicamente às alterações que ocorrem no ambiente cerebral (Biswas K, 2023; Xu Y, 2023; Gao C, 2023).

A microglia é frequentemente estudada por meio de modelos de cultura de células primárias. No entanto, esses modelos apresentam baixa disponibilidade celular e limitada capacidade de proliferação (Bohlen CJ, 2019). Diante disso, pesquisas voltadas ao estudo da microglia têm buscado modelos alternativos, com o objetivo de reduzir a utilização de animais e acelerar o avanço da pesquisa (Gao C, 2023). Um dos modelos alternativos mais utilizados para o estudo da microglia é a linhagem de células BV-2.

1.3.1 CÉLULAS BV-2

As células BV-2 se destacam como uma linhagem com fenótipo microglial derivada de camundongos. Essa linhagem foi estabelecida a partir da infecção de culturas primárias de células microgliais murinas com o oncogene v-raf/v-myc contendo o retrovírus J2 (Blasi E et al., 1990). As células da linhagem BV-2 apresentam diversas semelhanças com células da microglia *in vivo*, especialmente em relação à resposta inflamatória (Sarkar S et al., 2018). Foi demonstrado que essas células apresentam uma resposta inflamatória mais intensa do que a observada em células em culturas primárias, motivo pelo qual são amplamente utilizadas em investigações relacionadas à neuroinflamação e ao estresse oxidativo (Henn A et al., 2009). Além disso, são células que se proliferam rapidamente e de fácil manutenção.

Considerando que a microglia desempenha papel essencial na manutenção da homeostase cerebral (Sarlus H, 2017) e, quando reativa, pode colaborar para o dano ao SNC, torna-se relevante investigar a resposta microglial a altas concentrações de Phe. Tais achados poderão fornecer novas perspectivas para o entendimento da fisiopatologia da PKU.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar um modelo de cultura de células BV-2 para investigação da fisiopatologia da PKU.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar informações sobre a expressão dos genes *PAH*, *LAT1*, *LAT2*, *LAT3*, *LAT4* em diferentes tipos celulares do SNC e hepatócitos no banco de dados *The Human Protein Atlas*;
- Avaliar a expressão dos genes *Pah* e *Lat1* por RT-PCR em células BV-2;
- Avaliar o pH do meio de cultura sem células antes e após incubação na ausência ou presença de Phe;
- Avaliar a morfologia de células BV-2 incubadas com diferentes concentrações de Phe ou H₂O₂ por 24h, 48h e 72h;
- Avaliar a viabilidade celular de células BV-2 incubadas por 48h na ausência ou presença de diferentes concentrações de Phe ou H₂O₂;
- Avaliar o conteúdo de grupos sulfidríla em culturas de células BV-2 incubadas por 48h na ausência ou presença de diferentes concentrações de Phe ou H₂O₂.

3 METODOLOGIA

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Neste estudo, foram utilizadas linhagens de microglia de roedores imortalizada (células BV-2). Por se tratarem de linhagens adquiridas comercialmente (Banco de Células do Rio de Janeiro), não há necessidade de aprovação do protocolo experimental pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Para as análises de RT-PCR de células BV-2, foi utilizado como referência tecido hepático de camundongos *naïve*. A utilização dos animais para tal foi submetida e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (protocolo nº 120-24). Todos os esforços foram realizados para minimizar o número de animais utilizados e reduzir qualquer forma de sofrimento.

3.2 COLETA DE INFORMAÇÕES DO BANCO DE DADOS

Os dados da expressão dos genes *PAH*, *LAT1* (*SLC7A5*), *LAT2* (*SLC7A8*), *LAT3* (*SLC43A1*) e *LAT4* (*SLC43A2*) em diferentes neurônios excitatórios e inibitórios, células precursoras de oligodendrócitos (OPC), oligodendrócitos, astrócitos, microglia e hepatócitos de humanos foram coletados do banco de dados *The Human Protein Atlas* (disponível em <https://www.proteinatlas.org/>). Os dados coletados foram organizados em uma planilha eletrônica para posterior análise. Além disso, os valores apresentados correspondem à expressão de consenso normalizado (NX), uma métrica obtida a partir da integração dos dados de transcriptoma dos projetos *Genotype-Tissue Expression (GTEx)* e *FANTOM5*. Os resultados representam transcritos codificadores de proteína por milhão (TPM médio) normalizados (nTPM), que expressam a média da abundância de RNA mensageiro entre múltiplas amostras biológicas de cada tipo celular.

3.3 CULTURA DE CÉLULAS BV-2

Células da linhagem BV-2 foram cultivadas em meio DMEM-F12 (Sigma-Aldrich; D6421) contendo 1% de penicilina/streptomicina (Thermo Fisher Scientific; 15140122) com adição de 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich; F9665) em frascos de 25 cm². Os frascos

foram mantidos em incubadora (Harris Manufacturing; HSC501T-ABA) a 37 °C com atmosfera constituída de 95% ar e 5% CO₂. Quando atingiram a confluência, as células foram então plaqueadas em placas de 6 (100.000 células por poço) ou 24 poços (10.000 células por poço). Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído para o grupo controle. Para os grupos experimentais, foi adicionada ao meio Phe (Sigma-Aldrich; 78019,) nas concentrações de 1, 2,5 e 5 mM. O controle positivo consistiu na adição peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Neon; 01984) 0,1 mM. As células foram incubadas por 24, 48 ou 72 horas e, posteriormente, coletadas ou fixadas para as análises.

3.4 IMUNOCITOQUÍMICA

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços com lamínulas de vidro (K5-003, Olen), previamente tratadas com água régia e com poli-D-lisina (Gibco; A38904-01). Quarenta e oito horas após, o meio de cultura foi removido e as células foram então lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e fixadas com paraformaldeído (Sigma-Aldrich;1003665462) 4% por 15 minutos, permeabilizadas e bloqueadas com PBS contendo 0,1% de Triton X-100 (1685, Neon) e 5% de soro normal de cabra (Sigma-Aldrich; G9023) por duas horas. Após o bloqueio, as lamínulas foram então incubadas durante a noite a 4 °C com anticorpo primário para imunomarcação da molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1 (Iba1; 1:500; 019-19741, Wako), clássico marcador microglial, diluído em solução de bloqueio. Em seguida, as células foram lavadas novamente com PBS e incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho 594 (1:500; SAB4600099, Sigma-Aldrich) e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 1:20000; D1306, Invitrogen), para a marcação nuclear. Após as marcações, as células foram lavadas com PBS e as lâminas foram montadas com solução de N-propil-galato (Sigma-Aldrich; 102644577) saturada em PBS. Controles negativos foram utilizados substituindo o anticorpo primário pela solução de bloqueio. A aquisição de imagens foi realizada por microscopia de fluorescência (Zeiss Axioplan, modo Apotome) e analisadas visualmente pelo programa ZEN (versão 3.9).

3.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *Lat1* E *Pah* em CÉLULAS BV-2

O RNA total foi extraído de células BV-2 e de camundongos usando Trizol (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. A pureza e a integridade do RNA foram avaliadas usando a razão de absorvância de 260/280 determinada por Nanodrop e apenas preparações com valores $\geq 1,8$ foram usadas. Para PCR de transcrição reversa quantitativa em

tempo real (qRT-PCR), 1 µg de RNA foi usado para a síntese de DNA complementar (cDNA) usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Thermo Fisher Scientific). A análise quantitativa da expressão de genes alvo foi realizada em um sistema de PCR em tempo real 7500 (Thermo Fisher Scientific) com PowerUp SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Foram usados primers específicos de *Lat1* (*mLat1*; fw: TGTCCCTCAAACGTCAGGTG; bw: GATGTGGCAGTCCCCAGAAA) e *Pah* (*mPah*; fw: GCGGTTTCCGTGAAGACAAC; bw: GTGCAGTGGAAGACTCGGAA). Foi utilizado o gene de β -actina (*actb*; fw: TGTGACGTTGACATCCGTAAA; rv: GTACTTGCGCTCAGGAGGAG) como gene de referência endógeno. O qRT-PCR foi realizado em reações de 20 µL, de acordo com as instruções do fabricante. Os valores do limiar de ciclo (C_t) foram usados para calcular a mudança de expressão relativa aos controles usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

3.6 AVALIAÇÃO DO pH NO MEIO DE CULTURA

Soluções de meio de cultura DMEM-F12 (Sigma-Aldrich; D6421) com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich; F9665) contendo Phe 5 mM ou H₂O₂ 0,1 mM foram colocadas em placas de cultura sem células e mantidas por 48h em incubadora a 37 °C com atmosfera controlada (5% CO₂ e 95% ar). Antes e após a incubação, as soluções tiveram seu pH medido em pHmetro previamente calibrado. Como controle, foram utilizadas alíquotas de meio de cultura sem adição de Phe ou H₂O₂.

3.7 MICROSCOPIA EM CAMPO CLARO

A cada 24h após a adição de Phe ou H₂O₂ às células, foram obtidas imagens por microscopia óptica em campo claro (Nikon TMS) em aumento de 40x com o auxílio de uma câmera de celular (Iphone 14, Apple), até o tempo de incubação completar 72h.

3.8 ATIVIDADE DA ENZIMA LACTATO DESIDROGENASE (LDH)

A avaliação da viabilidade celular foi realizada pela determinação da atividade da enzima LDH, através do kit LDH Liquiform (86-2/30, LabTest, Brasil). Após 48h de incubação com Phe, o meio de cultura foi coletado para a medida da atividade da LDH liberada para o meio extracelular (LDHe). Após a coleta do meio, as células foram então permeabilizadas com uma solução de saponina (Sigma-Aldrich; 1003597228) 30 µg/mL em meio de cultura fresco e incubadas por 5 min a 37 °C. Ao final da incubação, o meio de cultura contendo saponina foi coletado para a medida da atividade da LDH intracelular (LDHi). Foi então calculada a atividade total da LDH (LDHe + LDHi) e a porcentagem de LDH liberada para o meio (LDHe). Os dados estão expressos em U/mL para a atividade total da LDH e em porcentagem de LDH liberada, respectivamente (Chan FK et al., 2013). Triton X-100 0,1% foi utilizado como controle positivo de rompimento da membrana plasmática celular e consequente liberação de LDH para o meio de cultura.

3.9 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE GRUPOS SULFIDRILA

O conteúdo total de grupos sulfidrilas foi determinado pelo método de Aksenov e Markesbery (2001). Os grupos sulfidrilas não oxidados reduzem o ácido ditionitrobenzoico (DTNB), levando à formação de ácido 2-nitro-5-mercaptopbenzoico (TNB), um produto de cor amarela lido em espectrofotômetro a 412 nm. A concentração de grupos sulfidrilas foi calculada de acordo com o coeficiente de extinção molar do TNB e está expressa em nmol de TNB/mg de proteína.

3.10 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS

A quantificação de proteínas totais foi realizada segundo o método de Lowry (1951), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

3.11 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Todos os experimentos foram realizados em duplicata ou triplicata de 3-6 culturas

celulares independentes. Os dados coletados foram avaliados quanto à normalidade da distribuição pelo teste de Shapiro–Wilk. As médias foram comparadas por meio da análise de variância de uma via (ANOVA) , seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, ou pelo teste de Kruskal–Wallis, seguido do teste de Dunn, quando aplicável. As análises estatísticas e a construção dos gráficos foram realizadas usando o site BioRender (<https://www.biorender.com>) e foram consideradas estatisticamente significativas quando $p<0,05$.

4 RESULTADOS

Primeiramente, foram coletados do Atlas de Proteínas Humanas dados da expressão dos genes *LAT1*, *LAT2*, *LAT3*, *LAT4* e *PAH* em astrócitos, microglia, neurônios excitatórios, neurônios inibitórios, oligodendrócitos, células precursoras de oligodendrócitos (OPC) e hepatócitos de humanos. A figura 4 mostra que, dentre todas as células avaliadas, a microglia apresenta a maior expressão de gene *LAT1* (104,7 nTPM) em comparação com hepatócitos (14,1 nTPM) e com outros tipos celulares do SNC.

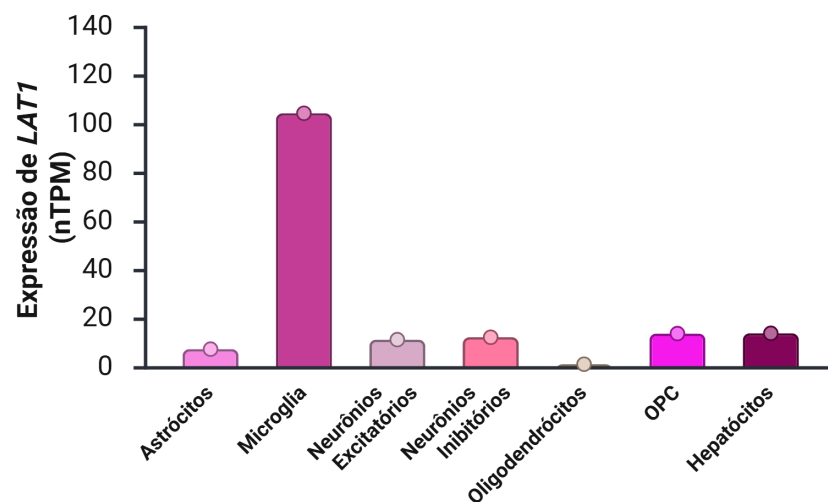


Figura 4 - Expressão do gene *LAT1* em diferentes tipos celulares do sistema nervoso central e hepatócitos de humanos. Os dados representam a média para cada tipo celular (n=1) e os valores estão expressos em transcritos codificadores de proteína por milhão normalizados (nTPM). OPC: células precursoras de oligodendrócitos.

Também foram coletados dados da expressão dos genes *LAT2*, *LAT3* e *LAT4*, que codificam outras proteínas transportadoras de aminoácidos. Na Figura 5, pode-se observar que as células da microglia humana expressam os 4 tipos de transportadores, mas que os genes *LAT2* (15,2 nTPM), *LAT3* (0,9 nTPM) e *LAT4* (13,4 nTPM) apresentam uma expressão marcadamente menor na microglia em comparação com o transportador *LAT1*, sugerindo que este de fato seja seu principal transportador de aminoácidos. Além disso, dentre as células analisadas, pode-se observar que *LAT2* e *LAT4* são mais expressos em neurônios, enquanto *LAT3* é preferencialmente expresso em hepatócitos.

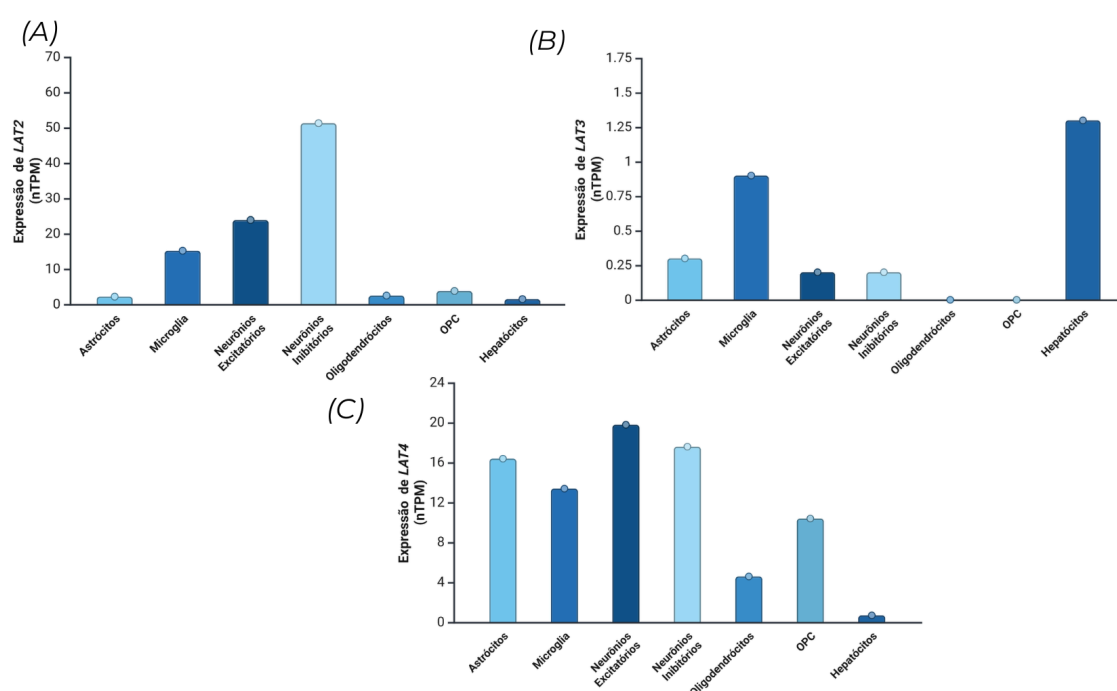


Figura 5 - Expressão dos genes *LAT2*, *LAT3* e *LAT4* em diferentes tipos celulares do sistema nervoso central e hepatócitos de humanos. Figura 5A - *LAT2*; Figura 5B - *LAT3* e Figura 5C - *LAT3*. Os dados representam a média para cada tipo celular (n=1) e os valores estão expressos em transcritos codificadores de proteína por milhão normalizados (nTPM). OPC: células precursoras de oligodendrócitos.

O próximo passo foi comparar a expressão do gene *PAH* em diferentes tipos de células do SNC e hepatócitos humanos (Figura 6). Os dados obtidos mostraram que, como esperado, a célula que apresenta a maior expressão de *PAH* é o hepatócito (742,1 nTPM), enquanto a expressão desse gene nas demais células é mínima, como em astrócitos (0,9 nTPM), ou inexistente, como na microglia e em oligodendrócitos.

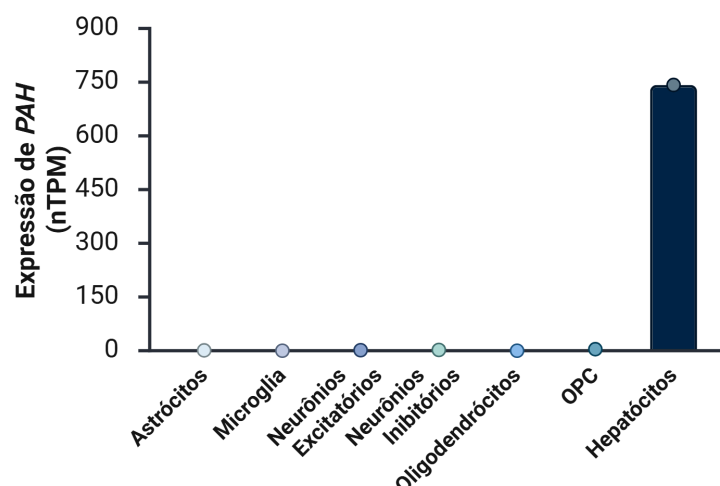


Figura 6 - Expressão do gene *PAH* em diferentes tipos celulares do sistema nervoso central e hepatócitos de humanos. Os dados representam a média para cada tipo celular (n=1) e os valores estão expressos em transcritos codificadores de proteína por milhão normalizados (nTPM). OPC: células precursoras de oligodendrócitos.

Após a identificação do perfil de expressão de proteínas transportadoras e do metabolismo da Phe em microglia humana, o próximo passo foi caracterizar as células da linhagem BV-2 como possível modelo celular de microglia para o estudo da fisiopatologia da PKU. Avaliou-se inicialmente a expressão gênica de *Lat1*, principal transportador de Phe presente na microglia humana, e *Pah* em células BV-2 por RT-qPCR. A Figura 7 mostra que, da mesma forma que a microglia humana, essas células apresentam uma alta expressão de *Lat1* relativamente ao tecido hepático de camundongos e não expressam *Pah*.

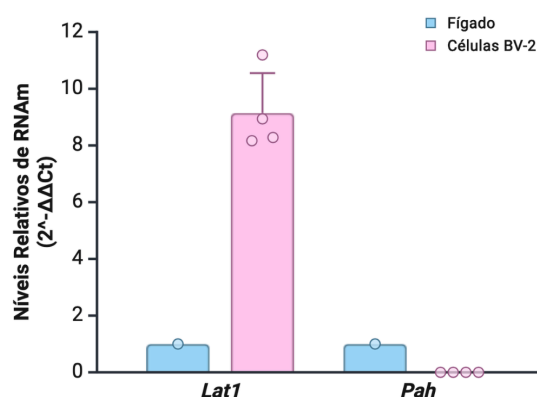


Figura 7 - Níveis relativos de RNAm dos genes *Lat1* e *Pah* em células BV-2 determinados por RT-PCR. Os dados representam 4 culturas independentes (n=4) de células BV-2 e fígado de 1 camundongo controle (n=1). *beta-Actina* foi utilizado como gene constitutivo.

A seguir, para se conhecer a morfologia das células BV-2, essas células foram incubadas com ou sem H_2O_2 0,1 mM por 48h. Na Figura 8 é possível observar que as células BV-2 são pequenas e apresentam uma morfologia arredondada. Além disso, a incubação com H_2O_2 , um conhecido indutor de morte celular, diminuiu o número e alterou a morfologia e o tamanho das células em comparação com as células do grupo controle.

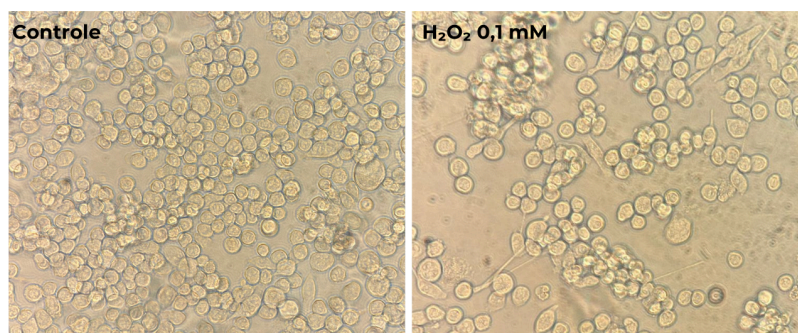


Figura 8 - Análise qualitativa da morfologia de células BV-2 (controle) e H_2O_2 0,1 mM (controle positivo) após 48 horas de incubação. Imagem representativa de 2 culturas independentes em aumento de 40x.

O próximo passo foi realizar uma imunomarcagem com Iba1, um clássico marcador de células microgliais, das células BV-2. Como esperado, a Figura 8 mostra que essas células apresentam intensa marcação anti-Iba1 (verde), confirmando que as células BV-2 apresentam características fenotípicas microgliais.

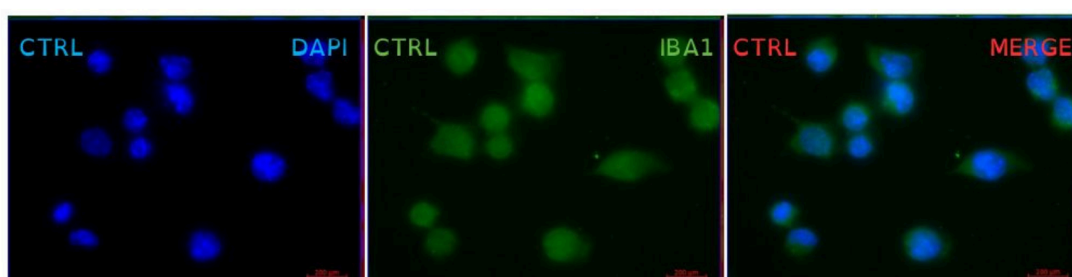


Figura 9 - Imunomarcagem da proteína Iba1 em células BV-2 incubadas com meio de cultura por 48h. Imagens representativas de 3 culturas independentes (n=3) realizadas em duplicata em aumento de 63x. CTRL: controle. Barra da escala: 200 μm .

Considerando-se que o pH é um importante fator para a manutenção da função celular, o próximo passo foi avaliar possíveis variações de pH no meio de cultura causadas por Phe ou H₂O₂. Foram, então, realizadas medições do pH do meio de cultura com Phe ou H₂O₂ antes e após 48h na incubadora. A Tabela 1 mostra os valores de pH para soluções controle (apenas meio), Phe 5 mM e H₂O₂ 0,1 mM antes e após 48h de incubação, bem como a diferença entre o pH inicial e o pH final. Pode-se observar que os valores de pH das três soluções apresentaram mínima variação nesse período, permitindo excluir possíveis interferências de variações de pH causadas pelos compostos a serem utilizados nos experimentos.

Tabela 1 - Valores de pH do meio de cultura incubados com Phe 5 mM e H₂O₂ 0,1 mM antes e após 48 horas de incubação.

Grupo	pH do meio de cultura		Diferença de pH
	t=0	t=48h	
Amostra 1			
Controle	7,4	7,45	0,05
Phe 5 mM	7,44	7,5	0,06
H ₂ O ₂ 0,1 mM	7,42	7,45	0,03
Amostra 2			
Controle	7,4	7,41	0,01
Phe 5 mM	7,42	7,44	0,02
H ₂ O ₂ 0,1 mM	7,41	7,42	0,01

A seguir, células da linhagem BV-2 foram incubadas com Phe (1, 2,5 ou 5 mM) ou H₂O₂ 0,1 mM por 72h. A cada 24h após a adição dos compostos ao meio de cultura, foram adquiridas imagens em campo claro das culturas. A Figura 11 mostra imagens representativas dessas culturas após 24, 48 e 72 horas de incubação. As células incubadas com H₂O₂ apresentaram, como esperado, alterações morfológicas e redução do número de células em comparação ao controle que podem ser observadas desde as primeiras 24h de incubação. As células expostas à Phe 5 mM também exibiram alterações morfológicas, embora distintas daquelas induzidas pelo H₂O₂, após 24h de incubação. As concentrações mais baixas de Phe testadas (1 e 2,5 mM) também promoveram alterações morfológicas, porém mais sutis quando comparadas ao grupo controle. Após 72h de incubação, verificou-se um intenso descolamento celular em praticamente todos os grupos experimentais, indicando que

períodos maiores do que 48h de incubação poderiam comprometer a integridade da cultura independentemente de qualquer tratamento.

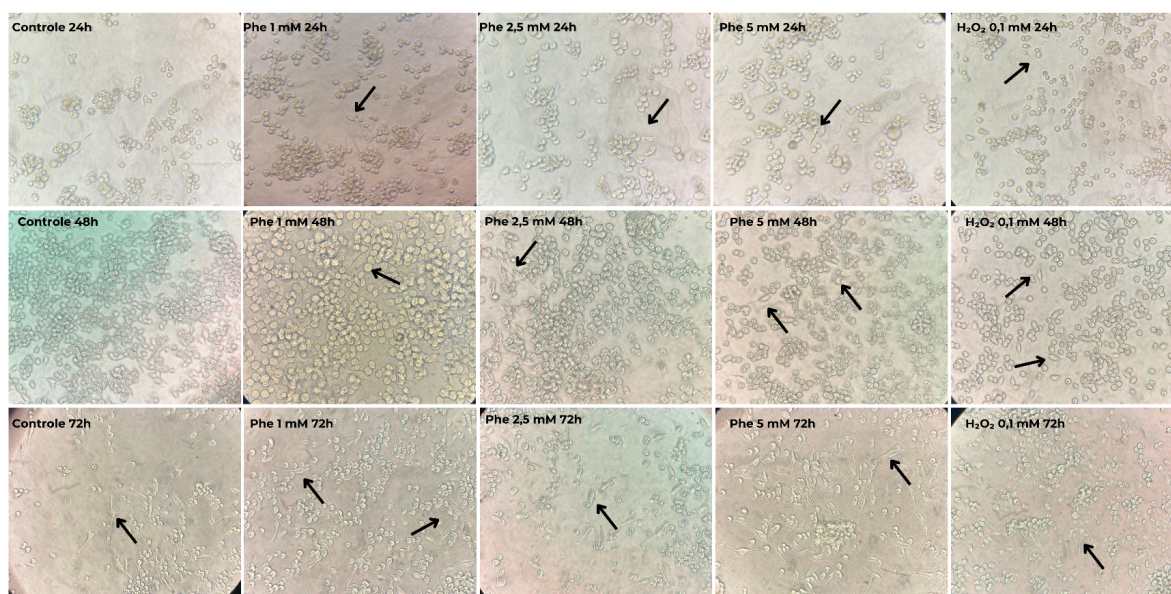


Figura 10 - Análise qualitativa da morfologia e da proliferação celular de células BV-2 incubadas com fenilalanina (Phe) ou H₂O₂ 0,1 mM 48h por 24h, 48h e 72h. Imagens de 1 cultura em campo claro em aumento de 40x.

Sabendo-se que a Phe induziu morte celular em trabalhos com outros modelos celulares, avaliou-se a viabilidade celular de células BV-2 incubadas com Phe (1, 2,5 ou 5 mM) ou H₂O₂ 0,1 mM por 48h através da medida da liberação de LDH para o meio de cultura em decorrência do comprometimento da integridade da membrana plasmática celular. Além disso, também foi medida a atividade total da LDH nas mesmas células.

Na Figura 10A pode-se observar que, nas concentrações de 2,5 e 5 mM, a Phe inibiu a atividade total da LDH em comparação às células do grupo controle, o que não foi observado nas células incubadas com Phe 1 mM ou com H₂O₂ 0,1 mM. Por outro lado, a Figura 10B mostra que tanto Phe 5 mM quanto H₂O₂ 0,1 mM induziram uma maior liberação de LDH pelas células, indicando uma diminuição da viabilidade celular nessas condições.

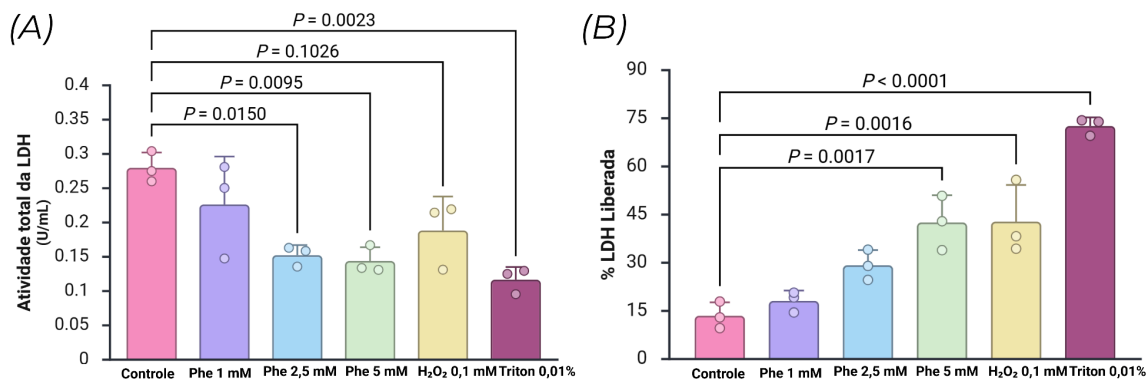


Figura 11 - Atividade da lactato desidrogenase (LDH) em células BV-2 incubadas com diferentes concentrações de fenilalanina (Phe) ou com H₂O₂ 0,1 mM. (A) Atividade total de LDH (B) Atividade da lactato desidrogenase (LDH) liberada para o meio de cultura. Os valores representam média \pm desvio padrão de 3 culturas independentes por grupo e estão expressos em μ mol/mg de proteína (teste de normalidade de Shapiro-Wilk; teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn).

Por fim, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de Phe sobre o conteúdo de grupos sulfidril, um parâmetro comumente utilizado como indicador de estado redox celular, em células BV-2. A Figura 12 mostra uma diminuição do conteúdo de grupos sulfidril nas células incubadas com Phe 5 mM ou com H₂O₂ 0,1 mM, o que sugere um possível desequilíbrio redox nessas células.

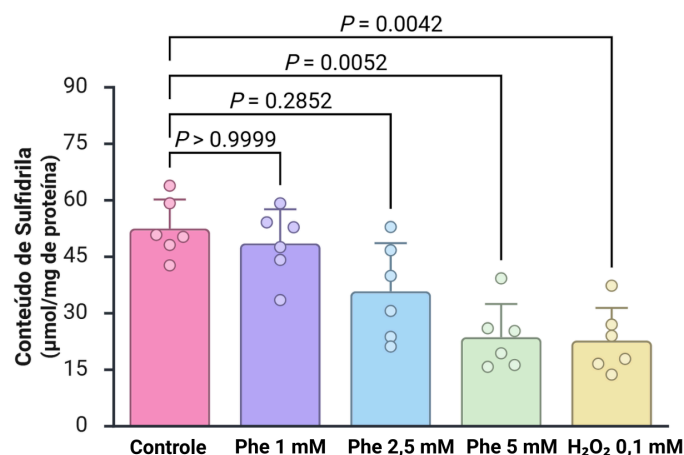


Figura 12 - Efeito *in vitro* de diferentes concentrações de fenilalanina (Phe) sobre o conteúdo de grupos sulfidril em células BV-2. Os valores representam média \pm desvio padrão de 6 culturas independentes e estão expressos em μ mol/mg de proteína (teste de normalidade de Shapiro-Wilk; teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn).

5 DISCUSSÃO

Estudos recentes têm indicado um possível papel da neuroinflamação na fisiopatologia da PKU (Cicek C et al., 2022; 2024; Faverzani JL et al., 2025). Considerando-se que a microglia é o principal agente de resposta imune no SNC (Colonna M, 2017), e que até o momento não há estudo sobre o papel da microglia na fisiopatologia da PKU, o presente estudo teve como objetivo caracterizar um modelo experimental de células da microglia para investigar aspectos da fisiopatologia da PKU utilizando células da linhagem BV-2 .

Inicialmente, realizou-se busca em bancos de dados sobre a expressão dos genes *LAT1*, *LAT2*, *LAT3* e *LAT4*, que codificam os principais transportadores de aminoácidos, com o objetivo de avaliar seu padrão de expressão em células da microglia. Os dados obtidos no banco *The Human Protein Atlas* mostraram que o gene *LAT1* é altamente expresso na microglia humana, apresentando uma expressão marcadamente maior nessas células quando comparadas a outras células do SNC ou a hepatócitos. Esse resultado sugere que a microglia apresenta uma grande dependência dos aminoácidos grandes e neutros transportados pelo LAT1, incluindo os aminoácidos aromáticos Phe, Trp e Tyr. A grande necessidade desses aminoácidos pela microglia pode se dever à sua elevada demanda metabólica, decorrente especialmente de suas funções imunológicas, essenciais para a manutenção da homeostase cerebral (Hattori Y, 2023).

Embora o LAT1 seja o principal responsável pelo transporte de Phe em razão de sua alta afinidade por esse aminoácido (Uchino et al., 2002), outros transportadores, como LAT2, LAT3 e LAT4, também podem contribuir para o transporte de Phe para as células (Wang Q, 2015). Os dados da expressão dos genes que codificam esses transportadores obtidos do atlas demonstram que, ainda que haja expressão de *LAT2*, *LAT3* e *LAT4* nas células da microglia humana, esta é muito inferior à expressão do *LAT1*, corroborando a ideia de que este é o principal transportador de aminoácidos nas células da microglia e, portanto, o principal responsável pelo transporte de Phe para dentro dessas células. Entretanto, não se pode excluir que, enquanto o LAT1 é o principal mediador da entrada de Phe, o LAT2 e o LAT4 possam desempenhar um papel coadjuvante, exacerbando a entrada e a distribuição de Phe pela célula.

Ainda que a literatura já tenha descrito que a PAH, principal enzima responsável pela metabolização da Phe, seja predominantemente localizada no fígado, compilou-se os dados

de sua expressão em diferentes células do SNC e em hepatócitos. Como esperado, os resultados mostraram que a microglia não expressa esse gene, ao contrário dos hepatócitos. Para avaliar se as células da linhagem BV-2 apresentam o mesmo perfil de expressão das células de microglia humana, foi realizada a análise da expressão dos genes *Lat1* e *Pah* nas células BV-2. Os resultados demonstraram uma alta expressão do gene *Lat1* e a ausência de expressão do gene *Pah* nessa linhagem celular, assemelhando-se ao perfil observado nos dados de células humanas. Esses achados corroboram o estudo de Tampio et al. (2024), que também observou a expressão de *Lat1* em células BV-2. Tomadas em conjunto, essas informações indicam que a Phe pode ser captada pelas células BV-2, mas possivelmente não será metabolizada pela PAH, excluindo a necessidade do uso de inibidores dessa enzima durante os experimentos para se avaliar os efeitos do acúmulo de Phe.

Para se conhecer a morfologia das células da linhagem BV-2, essas células foram incubadas na ausência (grupo controle) ou presença de H₂O₂ por 48h. Imagens de microscopia óptica em campo claro mostraram que as células BV-2 possuem formato arredondado e ausência de ramificações, em contraste com células da microglia *in vivo*, que exibem morfologia mais ramificada (Sarkar et al., 2018). É importante salientar que, embora haja diferenças morfológicas, estudos comparativos mostraram semelhanças entre células BV-2 e microglia *in vivo* na intensidade da resposta ao induzir um cenário de neuroinflamação ou estresse oxidativo, sendo amplamente utilizado para esse tipo de investigação (Henn et al., 2009). Adicionalmente, as células BV-2 também apresentaram intensa marcação para a proteína Iba1. Essa proteína é considerada um marcador clássico de microglia, sendo bem estabelecido que seu mRNA é expresso em células da microglia provenientes de camundongos (Yamada, M et al., 2006). Dessa forma, as células BV-2 apresentam de fato um fenótipo microglial (Ito et al., 1998), como esperado.

Para se eliminar possível viés causado por alterações de pH nas soluções contendo os compostos a serem testados, procurou-se avaliar a estabilidade do pH do meio de cultura contendo Phe ou H₂O₂ em um período semelhante ao tempo de incubação das células. Sabe-se que o aumento do pH em culturas celulares acelera os movimentos celulares, enquanto sua redução os retarda (Taylor AC, 1962; Michl J et al., 2019). Dessa forma, foram mensurados os valores de pH em meio de cultura na presença de Phe ou H₂O₂ mantido em placas de cultura sem células em incubadora a 37 °C e atmosfera controlada por 48h antes e após a incubação. Não foi evidenciada variação de pH entre as medidas pré- e pós-incubação. Tal fato permite concluir que os possíveis efeitos observados nas células após a incubação

resultem de uma ação direta dos compostos, e não de uma possível variação do pH do meio de cultura.

De posse dessas informações, procurou-se a seguir identificar o melhor intervalo de tempo para a análise dos efeitos da Phe nas células BV-2. A utilização de H_2O_2 como controle positivo também fornece uma importante validação para o estudo, uma vez que seus efeitos neurotóxicos notadamente conhecidos incluem aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), ativação de vias apoptóticas e morte celular (Hou RC et al., 2005; Cobourne-Duval MK et al., 2017). Assim, foram obtidas imagens de culturas de células BV-2 incubadas na ausência (controle) ou presença de Phe ou de H_2O_2 a cada 24h por um período de 72h. Tanto o H_2O_2 quanto a Phe na concentração de 5 mM induziram alterações morfológicas e de número de células ainda nas primeiras 24h de incubação. Após 48 h de incubação, foi possível observar diferenças mais evidentes tanto no número de células quanto nas morfologia, tanto no controle positivo quanto nas demais concentrações de Phe, caracterizando esse período como um intervalo adequado para identificar modificações celulares e possivelmente detectar um nível intermediário de morte celular. Ao final das 72 h de incubação, verificaram-se alterações morfológicas em todos os grupos, acompanhadas de descolamento celular generalizado, indicando que as células não toleram um período prolongado de incubação. A partir dessas informações, o período de 48h foi escolhido como tempo de incubação das culturas de células BV-2 para os experimentos a serem realizados.

Considerando-se a observação da aparente redução do número de células nos poços que receberam meio de cultura contendo Phe, avaliou-se a viabilidade celular pela determinação da liberação de LDH. A LDH é uma enzima intracelular, citosólica, responsável pela oxidação reversível de lactato a piruvato, que é liberada para o meio extracelular quando há comprometimento da integridade da membrana plasmática celular (Kumar, 2018). Assim, a medida da atividade da LDH liberada pelas células para o meio de cultura durante a incubação é um indicativo da integridade celular e, portanto, da viabilidade da célula. A incubação com Phe 5 mM ou com H_2O_2 por 48h aumentou a liberação de LDH para o meio de cultura, indicando que houve uma diminuição da viabilidade celular nessas condições, o que não foi observado nas células incubadas com concentrações mais baixas de Phe. É importante salientar que a avaliação de viabilidade celular pela liberação de LDH não fornece informações sobre o tipo ou a causa da morte celular observada. Entretanto, estudos anteriores relataram que concentrações elevadas de Phe induzem EO e reduzem a viabilidade celular em astrócitos (Preissler et al., 2016) e induzem morte celular por apoptose em culturas

primárias de neurônios (Huang X et al., 2013).

Também foi possível observar que a incubação com Phe nas concentrações de 2,5 e 5 mM por 48h inibiu a atividade total (intra e extracelular) da enzima LDH. Nesse contexto, quando ocorre comprometimento da atividade da LDH, a conversão de lactato em piruvato (e vice-versa) é reduzida. Estudos prévios relataram comprometimento bioenergético em córtex cerebral, estriado e hipocampo de ratos submetidos a altas concentrações de Phe (Dimer NW et al., 2018) e em pacientes fenilcetonúricos (Trefz F et al., 2024), mas não há dados na literatura quanto aos efeitos da Phe sobre a bioenergética celular na microglia.

Torna-se importante ressaltar que a inibição da atividade da LDH pela Phe não compromete a interpretação da liberação desta enzima como medida de viabilidade celular, uma vez que as análises avaliam aspectos distintos. A viabilidade celular é determinada pela atividade da LDH liberada para o meio de cultura em relação à atividade da LDH total presente na célula. Assim, mesmo que a Phe iniba a atividade total, a atividade da LDH liberada será inibida na mesma proporção que a atividade total.

Um dos poucos mecanismos fisiopatológicos da PKU mais bem descritos é a indução de estresse oxidativo induzido por altas concentrações de Phe (Dobrowolski SF et al., 2022). O EO caracteriza-se pelo desequilíbrio entre a produção de ERO e a capacidade do sistema antioxidante celular em neutralizá-las (Teleanu et al., 2022). Essa alteração na homeostase redox é altamente deletéria ao SNC, alterando a função e induzindo morte celular (Birben et al., 2012). Considerando que a neuroinflamação está intimamente relacionada ao estresse oxidativo, a microglia desempenha papel fundamental na manutenção da homeostase redox no SNC. Por exemplo, quando da reatividade microglial em resposta à atividade inflamatória, a enzima mieloperoxidase intensifica a produção de ERO (Block et al., 2007). Além disso, evidências indicam que compostos antioxidantes podem inibir a reatividade microglial e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Ferreira-Chamorro et al., 2018; He et al., 2022).

Nesse contexto, avaliou-se o efeito da incubação de Phe sobre o conteúdo de grupos sulfidril em células BV-2. O conteúdo de sulfidrila é considerado um marcador bioquímico de homeostase redox, especialmente no que tange ao dano oxidativo proteico. Observou-se que a maior concentração testada de Phe e o H_2O_2 induziram uma diminuição do conteúdo de sulfidrila totais. Esse resultado sugere alterações no estado redox das proteínas, possivelmente devido à oxidação de grupos $-SH$ presentes em resíduos de cisteínas e outros aminoácidos sulfurados e/ou à formação de ligações dissulfeto (Hudson D.

A et al., 2015). Não se pode excluir, no entanto, que a Phe possa alterar outros compostos sulfidrílicos, como a glutathiona, o principal antioxidante não enzimático do organismo (Sabens Liedhegner, E. A et al., 2012). Estudos anteriores demonstraram que a Phe induz diminuição do conteúdo de grupos sulfidrilas tanto em amostras de fluidos biológicos de pacientes quanto em estruturas cerebrais de modelos animais de PKU (Fernandes CG et al., 2010 ; Colomé, C et al., 2003).

Tomados em conjunto, os resultados do presente trabalho indicam que as células da linhagem BV-2 podem constituir um bom modelo experimental para o estudo dos efeitos da Phe sobre a função microglial. A caracterização deste modelo experimental permitirá o avanço no entendimento da fisiopatologia dos danos neurológicos observados em pacientes fenilcetonúricos e, assim, estabelecer possíveis alvos terapêuticos para a PKU.

6 CONCLUSÃO

As células da linhagem BV-2 expressam o gene *Lat1*, não expressam o gene *Pah* e são suscetíveis a efeitos tóxicos conhecidos da Phe, tornando-as um bom modelo experimental para o estudo do papel da microglia na fisiopatologia da PKU (Figura 13).

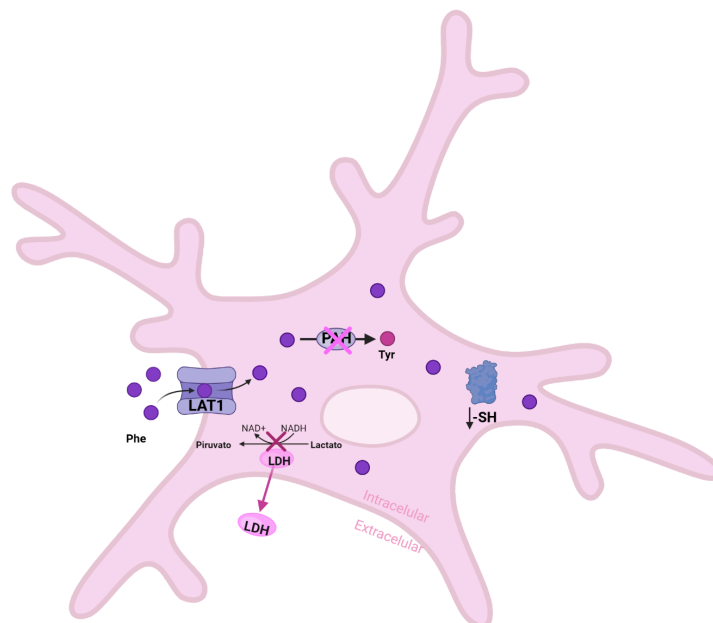


Figura 13 - Uso de células BV-2 como modelo experimental para estudo dos efeitos da fenilalanina (Phe).

LAT1= Transportador de aminoácidos grandes e neutros do tipo 1; LDH= Lactato desidrogenase; SH= Grupo Sulfidríla; Tyr= tirosina. Criada com Biorender.

7 PERSPECTIVAS

- Avaliar a morfologia celular de células BV-2 incubadas com diferentes concentrações de Phe por 48h;
- Determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em células BV-2 incubadas com diferentes concentrações de Phe por 48h;
- Determinação da atividade de enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase células BV-2 incubadas com diferentes concentrações de Phe por 48h;
- Determinação das concentrações de nitratos e nitritos em células BV-2 incubadas com diferentes concentrações de Phe por 48h.

REFERÊNCIAS

- AKSENOV, M. Y. et al. Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, v. 103, n. 2, p. 373–383, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00580-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00580-7). Acesso em: 29 out. 2025.
- AL HAFID, N. et al. Phenylketonuria: a review of current and future treatments. *Translational Pediatrics*, v. 4, n. 4, p. 304–317, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3978/j.issn.2224-4336.2015.10.07>. Acesso em: 2 jun. 2025.
- AMPIO, J. et al. The L-type amino acid transporter 1 enhances drug delivery to the mouse pancreatic beta cell line (MIN6). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 203, p. 106937, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39419128/>. Acesso em: 29 out. 2025.
- ANIKSTER, Y. et al. Biallelic Mutations in DNAJC12 Cause Hyperphenylalaninemia, Dystonia, and Intellectual Disability. *American Journal of Human Genetics*, v. 100, n. 2, p. 257–266, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.01.002>. Acesso em: 2 jun. 2025.
- ARIAS-BARRAU, E. et al. The Homogentisate Pathway: a Central Catabolic Pathway Involved in the Degradation of L-Phenylalanine, L-Tyrosine, and 3-Hydroxyphenylacetate in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, v. 186, n. 15, p. 5062–5077, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JB.186.15.5062-5077.2004>. Acesso em: 2 jun. 2025.
- BARTLETT, G. J. et al. Analysis of catalytic residues in enzyme active sites. *Journal of Molecular Biology*, v. 324, n. 1, p. 105–121, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)01036-7](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)01036-7). Acesso em: 4 jun. 2025.
- BERGUIG, G. Y. et al. Of mice and men: plasma phenylalanine reduction in PKU corrects neurotransmitter pathways in the brain. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 128, n. 4, p. 422–430, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.08.004>. Acesso em: 29 out. 2025.
- BISWAS, K. Microglia mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases: A review on the cell signaling pathways involved in microglial activation. *Journal of Neuroimmunology*, v. 383, p. 578180, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2023.578180>. Acesso em: 2 jun. 2025.
- BLASI, E. et al. immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *Journal of Neuroimmunology*, v. 27, n. 2–3, p. 229–237, 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(90\)90073-V](https://doi.org/10.1016/0165-5728(90)90073-V). Acesso em: 29 out. 2025.
- BOBROVA, N. A. et al. Experimental animal models of phenylketonuria: pros and cons. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 26, n. 11, p. 5262, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms26115262>. Acesso em: 29 out. 2025.

BODOY, S. et al. Identification of LAT4, a novel amino acid transporter with system L activity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, p. 12002–12011, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M413027200>. Acesso em: 29 out. 2025.

BOHLEN, C. J. et al. Isolation and Culture of Microglia. *Current Protocols in Immunology*, v. 125, n. 1, p. e70, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cpim.70>. Acesso em: 2 jun. 2025.

BORGES, A. C. et al. Engineering organoids for in vitro modeling of phenylketonuria. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 14, p. 787242, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.787242>. Acesso em: 29 out. 2025.

BRASIL, Ministério da Saúde. FENILCETONÚRIA. Portaria SCTIE/SAES/MS n.º 12, de 10 de setembro de 2019. Disponível em: https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/protocolos/resumidos/pcdt_resumido_fenilcetonuria.pdf. Acesso em: 2 jun. 2025.

BRASS, C. A. et al. The effects of hyperphenylalaninemia on fetal development: a new animal model of maternal phenylketonuria. *Pediatric Research*, v. 16, n. 5, p. 388–394, 1982. Disponível em: <https://doi.org/10.1203/00006450-198205000-00014>. Acesso em: 29 out. 2025.

CAMPISTOL PLANA, J. Fenilcetonuria de diagnóstico precoce. Bases fisiopatológicas del daño neuronal y opciones terapéuticas [Early diagnosis of phenylketonuria. Physiopathology of the neuronal damage and therapeutic options]. *Medicina (B Aires)*. 2019;79 Supl 3:2-5. Disponível em: <https://www.scielo.org.ar/pdf/medba/v79s3/v79s3a02.pdf>. Acesso em: 2 jun. 2025.

CAPPELLETTI, S. et al. Cognitive findings and behavior in children and adolescents with phenylketonuria. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*, v. 34, n. 6, p. 392–398, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/DBP.0b013e31829a79ef>. Acesso em: 2 jun. 2025.

CHAN, F. K. et al. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods in Molecular Biology*, v. 979, p. 65-70, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-290-2_7. Acesso em: 10 nov. 2025.

ÇİÇEK, Ç. et al. Rat PKU Model Display Gender-Based Neuroinflammatory Changes: Proinflammatory Cytokines and Lipid Peroxidation. *Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Dergisi*, v. 11, n. 1, p. 30–37, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.47572/muskutd.1388547>. Acesso em: 2 jun. 2025.

CITRON, B. A. et al. Identity of 4a-carbinolamine dehydratase, a component of the phenylalanine hydroxylation system, and DCoH, a transregulator of homeodomain proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 89, n. 24, p. 11891–11894, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.11891>. Acesso em: 2 jun. 2025.

COBOURNE-DUVAL, M. K. et al. The antioxidant effects of thymoquinone in activated BV-2 murine microglial cells. *Neurochemical Research*, v. 41, n. 12, p. 3227-3238, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2047-1>. Acesso em: 10 nov. 2025.

COLOMÉ, C. et al. Plasma thiols and their determinants in phenylketonuria. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 57, n. 8, p. 964–968, 2003. DOI: 10.1038/sj.ejcn.1601631. Acesso em: 18 nov. 2025.

COLONNA, M. et al. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annual Review of Immunology*, v. 35, p. 441–468, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358> . Acesso em: 2 jun. 2025.

DEON, M. et al. Biomarcadores urinários de estresse oxidativo e perfil inflamatório plasmático em pacientes tratados com fenilcetonúricos. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 47, pt. B, p. 259–265, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.10.001>. Acesso em: 4 jun. 2025.

DIENEL, G. A.; CRUZ, N. F. Biochemical, metabolic, and behavioral characteristics of immature chronic hyperphenylalanemic rats. *Neurochemical Research*, v. 41, n. 1–2, p. 16–32, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1678-y>. Acesso em: 29 out. 2025.

DIMER, N. W. et al. Brain bioenergetics in rats with acute hyperphenylalaninemia. *Neurochemistry International*, v. 117, p. 188-203, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.01.001>..Acesso em: 2 jun. 2025.

DOBROWOLSKI, S. F. et al. Phenylketonuria oxidative stress and energy dysregulation: Emerging pathophysiological elements provide interventional opportunity. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 136, n. 2, p. 111–117, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2022.03.012>. Acesso em: 2 jun. 2025.

DYER, C. A. et al. Evidence for central nervous system glial cell plasticity in phenylketonuria. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v. 55, n. 7, p. 795–814, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00005072-199607000-00005>. Acesso em: 29 out. 2025.

FAVERZANI, J. L. et al. Increased cytokine levels induced by high phenylalanine concentrations in late diagnosis PKU patients compared to early diagnosis: Anti-inflammatory effect of L-carnitine. *Cell Biochemistry and Function*, v. 41, n. 4, p. 490–500, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cbf.3800>. Acesso em: 2 jun. 2025.

FAVERZANI, J. L. et al. L-carnitine protects against oxidative damage and neuroinflammation in cerebral cortex of rats submitted to chronic chemically-induced model of hyperphenylalaninemia. *Metabolic Brain Disease*, v. 40, n. 1, p. 108, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11011-025-01537-6>. Acesso em: 29 out. 2025.

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. 317–326, 2010.

Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10571-009-9455-6>. Acesso em: 29 out. 2025.

FERNSTROM, J. D. et al. Tyrosine, Phenylalanine, and Catecholamine Synthesis and Function in the Brain. *Journal of Nutrition*, v. 137, n. 6 Suppl 1, p. 1539S–1547S, 2007. Disponível em: <https://jn.nutrition.org/content/137/6/1539S>. Acesso em: 2 jun. 2025.

FLYDAL, M. I. et al. Phenylalanine hydroxylase: function, structure, and regulation. *IUBMB Life*, v. 65, n. 4, p. 341–349, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/iub.1150>. Acesso em: 2 jun. 2025.

FUMAGALLI, L. et al. Microglia heterogeneity, modeling and cell-state annotation in development and neurodegeneration. *Nature Neuroscience*, publicado online em 7 abr. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41593-025-01931-4>. Acesso em: 2 jun. 2025.

GAO, C. et al. Microglia in neurodegenerative diseases: mechanism and potential therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 8, n. 1, p. 359, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01588-0>. Acesso em: 5 jun. 2025.

GONZÁLEZ, M. J. et al. Neurological complications and behavioral problems in patients with phenylketonuria in a follow-up unit. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 104, suplemento, p. S73–S79, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.07.015>. Acesso em: 2 jun. 2025.

GÜTTLER, F. et al. Different phenotypes for phenylalanine hydroxylase deficiency. *Annals of Clinical Biochemistry*, v. 14, n. 3, p. 124–134, 1977. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/000456327701400125>. Acesso em: 2 jun. 2025.

HARDING, C. O. et al. Complete correction of hyperphenylalaninemia following liver-directed, recombinant AAV2/8 vector-mediated gene therapy in murine phenylketonuria. *Gene Therapy*, v. 13, n. 5, p. 457–462, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302678>. Acesso em: 29 out. 2025.

HATTORI, Y. The multifaceted roles of embryonic microglia in the developing brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 17, p. 988952, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.988952>. Acesso em: 2 jun. 2025.

HENN, A. et al. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX*, v. 26, n. 2, p. 83–94, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.14573/altex.2009.2.83>. Acesso em: 29 out. 2025.

HILLERT, A. et al. The Genetic Landscape and Epidemiology of Phenylketonuria. *American Journal of Human Genetics*, v. 107, n. 2, p. 234–250, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.06.006>. Acesso em: 2 jun. 2025.

HOOR, C. et al. Oxidative toxicity in BV-2 microglia cells: sesamol neuroprotection of H₂O₂ injury involving

activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1042, p. 279-285, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1196/annals.1338.050>. Acesso em: 10 nov. 2025.

HUANG, X. et al. The Fas/Fas ligand death receptor pathway contributes to phenylalanine-induced apoptosis in cortical neurons. *PLoS One*, v. 8, p. e71553, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071553>. Acesso em: 17 nov. 2025.

HUDSON, D. A. et al. Oxidative protein folding: from thiol-disulfide exchange reactions to the redox poise of the endoplasmic reticulum. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 80, p. 171-182, 2015. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.037. Acesso em: 18 nov. 2025.

KAJA, S. et al. Quantification of lactate dehydrogenase for cell viability testing using cell lines and primary cultured astrocytes. *Current Protocols in Toxicology*, v. 72, p. 2.26.1-2.26.10, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cptx.21>. Acesso em: 29 out. 2025.

KAUR, C. et al. Origin of microglia. *Microscopy Research and Technique*, v. 54, n. 1, p. 2-9, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jemt.1114>. Acesso em: 2 jun. 2025.

KIM, G. H.; KIM, J. E.; RHIE, S. J.; YOON, S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental Neurobiology*, v. 24, n. 4, p. 325-340, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.325>. Acesso em: 2 jun. 2025.

KIM, J. et al. Neurotoxicity of phenylalanine on human iPSC-derived cerebral organoids. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 136, n. 2, p. 132-144, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2022.04.005>. Acesso em: 4 jun. 2025.

KINDT, E. et al. The need of essential amino acids in children. An evaluation based on the intake of phenylalanine, tyrosine, leucine, isoleucine, and valine in children with phenylketonuria, tyrosine amino transferase defect, and maple syrup urine disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 33, n. 2, p. 279-286, 1980. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ajcn/33.2.279>. Acesso em: 2 jun. 2025.

KNOX, W. E. An evaluation of the treatment of phenylketonuria with diets low in phenylalanine. *Pediatrics*, v. 26, p. 1-11, 1960. Disponível em: <https://doi.org/10.1542/peds.26.1.1>. Acesso em: 2 jun. 2025.

KOPPES, E. A. et al. A porcine model of phenylketonuria generated by CRISPR/Cas9 genome editing. *JCI Insight*, v. 5, n. 20, e141523, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.141523>. Acesso em: 29 out. 2025.

KUMAR, P. et al. Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, v. 2018, n. 6, p. pdb.prot095497, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095497>. Acesso em: 29 out. 2025.

LICHTER-KONECKI, U. et al. Human phenylalanine hydroxylase gene expression in kidney and other nonhepatic tissues. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 67, n. 4, p. 308-316, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/mgme.1999.2880>. Acesso em: 10 nov. 2025.

LONGO, N. et al. Long-term safety and efficacy of pegvaliase for the treatment of phenylketonuria in adults: combined phase 2 outcomes through PAL-003 extension study. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, v. 13, n. 1, p. 108, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13023-018-0858-7>. Acesso em: 29 out. 2025.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925819524516>. Acesso em: 2 jun. 2025.

LU, J. et al. Phenylalanine-pyruvate aminotransferase activity in chicks subjected to phenylalanine imbalance or phenylalanine toxicity. *Poultry Science*, v. 88, n. 11, p. 2375-2381, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00082>. Acesso em: 10 nov. 2025.

MARTINEZ-CRUZ, F. et al. Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: prevention by melatonin, vitamin E, and vitamin C. *Journal of Neuroscience Research*, v. 69, n. 4, p. 550-558, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jnr.10307>. Acesso em: 29 out. 2025.

MASTROBERARDINO, L. et al. Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature*, v. 395, p. 288-291, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/26246>. Acesso em: 29 out. 2025.

MCDONALD, J. D. et al. Pahhph-5: a mouse mutant deficient in phenylalanine hydroxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 87, n. 5, p. 1965-1967, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1965>. Acesso em: 29 out. 2025.

MEDFORD, E. et al. Demographic and Psychosocial Influences on Treatment Adherence for Children and Adolescents with PKU: A Systematic Review. *JIMD Reports*, v. 39, p. 107-116, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/8904_2017_52. Acesso em: 2 jun. 2025.

MEIER C. et al. Activation of system L heterodimeric amino acid exchangers by intracellular substrates. *The EMBO Journal*. v. 21, n. 4, p. 580- 589, 2002. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11847106/>. Acesso em: 10 nov. 2025.

MICHL, J. et al. Evidence-based guidelines for controlling pH in mammalian live-cell culture systems. *Communications Biology*, v. 2, p. 144, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0393-7>. Acesso em: 29 out. 2025.

OBERDOERSTER, J. et al. Effect of phenylalanine and its metabolites on the proliferation and viability of neuronal and astroglial cells: possible relevance in maternal phenylketonuria. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 295, n. 1, p. 295-301, 2000. Disponível em:

<https://jpet.aspetjournals.org/content/295/1/295>. Acesso em: 29 out. 2025.

O'BRIEN, D. M. et al. The amino acids used in reproduction by butterflies: a comparative study of dietary sources using compound-specific stable isotope analysis. *Physiological and Biochemical Zoology*, v. 78, n. 5, p. 819–827, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/431191>. Acesso em: 2 jun. 2025.

PIETZ, J. et al. Cerebral energy metabolism in phenylketonuria: findings by quantitative In vivo ³¹P MR spectroscopy. *Pediatric Research*, v. 53, n. 4, p. 654–662, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000055867.83310.9E>. Acesso em: 2 jun. 2025.

PREISLER, T. et al. Phenylalanine induces oxidative stress and decreases the viability of rat astrocytes: possible relevance for the pathophysiology of neurodegeneration in phenylketonuria. *Metabolic Brain Disease*, v. 31, n. 3, p. 529–537, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11011-015-9763-0>. Acesso em: 2 jun. 2025.

ROVELLI, V. et al. Phenylketonuria and the brain. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 139, n. 1, p. 107583, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2023.107583>. Acesso em: 2 jun. 2025.

SAAD, L. O. et al. Lactate dehydrogenase activity is inhibited by methylmalonate in vitro. *Neurochemical Research*, v. 31, n. 4, p. 541–548, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9054-6>. Acesso em: 10 nov. 2025.

SABENS LIEDHEGNER, E. A. et al. Mechanisms of altered redox regulation in neurodegenerative diseases—focus on S-glutathionylation. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 16, n. 6, p. 543–566, 2012. DOI: 10.1089/ars.2011.4119. Acesso em: 18 nov. 2025.

SARKAR, S. et al. Characterization and comparative analysis of a new mouse microglial cell model for studying neuroinflammatory mechanisms during neurotoxic insults. *Neurotoxicology*, v. 67, p. 129–140, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.05.002>. Acesso em: 29 out. 2025.

SARLUS, H. et al. Microglia in Alzheimer's disease. *Journal of Clinical Investigation*, v. 127, n. 9, p. 3240–3249, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI90606>. Acesso em: 2 jun. 2025.

SCHUCK, P. F. et al. Phenylketonuria Pathophysiology: on the Role of Metabolic Alterations. *Aging and Disease*, v. 6, n. 5, p. 390–399, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.14336/AD.2015.0827>. Acesso em: 2 jun. 2025.

SCRIVER, C. R. et al. Amino acid metabolism and its disorders. *Major Problems in Clinical Pediatrics*, v. 10, p. 1–478, 1973.

SEKINE, Y. et al. Amino acid transporter LAT3 is required for podocyte development and function. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 20, p. 1586–1596, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1681/ASN.2008090988>. Acesso em: 29 out. 2025.

SHULKIN, B. L. et al. Inhibition of neutral amino acid transport across the human blood-brain barrier by phenylalanine. *Journal of Neurochemistry*, v. 64, n. 3, p. 1252–1257, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.64031252>. Acesso em: 29 out. 2025.

SIMON, K. R. et al. DNA damage induced by phenylalanine and its analogue p-chlorophenylalanine in blood and brain of rats subjected to a model of hyperphenylalaninemia. *Biochemistry and Cell Biology*, v. 91, n. 5, p. 319–324, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/bcb-2013-0023>. Acesso em: 4 jun. 2025.

SINGH, R. H. et al. Recommendations for the nutrition management of phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genetics in Medicine*, v. 16, n. 2, p. 121–131, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/gim.2013.179>. Acesso em: 2 jun. 2025.

SMITH, I. et al. Intelligence and quality of dietary treatment in phenylketonuria. *Archives of Disease in Childhood*, v. 65, n. 5, p. 472–478, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/ad.65.5.472>. Acesso em: 2 jun. 2025.

SUMAILY, K. M. et al. Phenylketonuria: A new look at an old topic, advances in laboratory diagnosis, and therapeutic strategies. *International Journal of Health Sciences*, v. 11, n. 5, p. 63–70, nov.-dez. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5669513/>. Acesso em: 2 jun. 2025.

SURTEES, R. et al. The neurochemistry of phenylketonuria. *European Journal of Pediatrics*, v. 159, suplemento 2, p. S109–S113, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/pl00014370>. Acesso em: 2 jun. 2025.

TAMPIO, J. et al. Improved L-type amino acid transporter 1 (LAT1)-mediated delivery of anti-inflammatory drugs into astrocytes and microglia with reduced prostaglandin production. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 601, p. 120565, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120565>. Acesso em: 29 out. 2025.

TAMPIO, J. et al. The L-type amino acid transporter 1 enhances drug delivery to the mouse pancreatic beta cell line (MIN6). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 203, p. 106937, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39419128/>. Acesso em: 29 out. 2025.

TAYLOR, A. C. Responses of cells to pH changes in the medium. *Journal of Cell Biology*, v. 15, n. 2, p. 201–209, 1962. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.15.2.201>. Acesso em: 29 out. 2025.

TELEANU, D. M. et al. An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 11, p. 5938, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23115938>. Acesso em: 2 jun. 2025.

THAU-ZUCHMAN, O. et al. High phenylalanine concentrations induce demyelination and microglial activation in mouse cerebellar organotypic slices. *Frontiers in Neuroscience*, v. 16, p. 926023, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.926023>. Acesso em: 29 out. 2025.

TREFZ, F. et al. Does hyperphenylalaninemia induce brain glucose hypometabolism? Cerebral spinal fluid

findings in treated adult phenylketonuric patients. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 142, p. 108464, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2024.108464>. Acesso em: 17 nov. 2025.

TYLEK-LEMAŃSKA, D. et al. Measurement of phenylalanine in blood on filter paper as a method of monitoring PKU treatment. *Journal of Medical Screening*, v. 9, n. 2, p. 64–66, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/jms.9.2.64>. Acesso em: 2 jun. 2025.

UCHINO, H. et al. Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanisms of substrate recognition. *Molecular Pharmacology*, v. 61, n. 4, p. 729–737, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/mol.61.4.729>. Acesso em: 29 out. 2025.

VAN DER GOOT, E. et al. Hippocampal microglia modifications in C57Bl/6 Pahenu2 and BTBR Pahenu2 phenylketonuria (PKU) mice depend on the genetic background, irrespective of disturbed sleep patterns. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 160, p. 139–143, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.05.002>. Acesso em: 2 jun. 2025.

VAN SPRONSEN, F. J. et al. Phenylketonuria. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 7, n. 1, p. 36, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00267-0>. Acesso em: 29 out. 2025.

WANG, Q. et al. L-type amino acid transport and cancer: targeting the mTORC1 pathway to inhibit neoplasia. *American Journal of Cancer Research*, v. 5, n. 4, p. 1281–1294, 2015. Disponível em: <https://www.ajcr.us/article.php?pid=201503150>. Acesso em: 29 out. 2025.

WILLIAMS, R. A. et al. Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. *The Clinical Biochemist Reviews*, v. 29, n. 1, p. 31–41, 2008. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2423317/>. Acesso em: 2 jun. 2025

WINN, S. R. et al. Blood phenylalanine reduction corrects CNS dopamine and serotonin deficiencies and partially improves behavioral performance in adult phenylketonuric mice. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 123, n. 1, p. 6–20, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.10.009>. Acesso em: 2 jun. 2025.

XU, Y. et al. New insight on microglia activation in neurodegenerative diseases and therapeutics. *Frontiers in Neuroscience*, v. 17, p. 1308345, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1308345>. Acesso em: 5 jun. 2025.

YAMADA, M. et al. X-ray structures of the microglia/macrophage-specific protein Iba1 from human and mouse demonstrate novel molecular conformation change induced by calcium binding. *Journal of Molecular Biology*, v. 364, n. 3, p. 449–457, 2006. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.09.027. Acesso em: 18 nov. 2025.

YU, Y. G. et al. Effects of phenylalanine and its metabolites on cytoplasmic free calcium in cortical neurons. *Neurochemical Research*, v. 32, n. 8, p. 1292–1301, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9303-3>. Acesso em: 2 jun. 2025.

ZHANG, J. et al.. Curcumin inhibits LPS-induced neuroinflammation by promoting microglial M2 polarization via TREM2/TLR4/NF- κ B pathways in BV2 cells. *Molecular Immunology*, v. 116, p. 29-37, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.09.020>. Acesso em: 10 nov. 2025.