

# Efeito da L-carnitina sobre o dano oxidativo ao DNA em pacientes fenilcetonúricos tratados

Faverzani J.L.<sup>a</sup>; Vargas C.R.<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> Serviço de Genética Médica – HCPA/ UFRGS

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFRGS

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Bioquímica, UFRGS,

## INTRODUÇÃO

A L-Carnitina (LC) possui um importante papel fisiológico no metabolismo energético celular e lipídico de mamíferos [1]. Estudos anteriores demonstraram que a LC possui efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios em várias condições fisiopatológicas, incluindo erros inatos do metabolismo [2,4]. Demonstrou-se que a suplementação com LC reduz o dano oxidativo a lipídeos e aumenta as defesas antioxidantes em pacientes fenilcetonúricos [3].

A fenilcetonúria (PKU) é uma doença autossômica recessiva do metabolismo de aminoácidos e é bioquimicamente caracterizada pela elevação e acúmulo de fenilalanina (FAL) e dos seus metabólitos em fluidos biológicos, e clinicamente por atraso mental grave e outras características neurológicas em pacientes não tratados [5]. O estresse oxidativo exerce um importante papel na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas, incluindo a PKU [3,6]. Nos últimos anos, tem sido investigado o papel do estresse oxidativo no dano neuronal na PKU, que poderia ser causado por FAL e seus metabólitos e/ou pela alteração do sistema antioxidante [6]. Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* com modelo animal PKU e pacientes PKU demonstraram o efeito da hiperfenilalaninemia no dano ao DNA [6-9].

## OBJECTIVO

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito da LC sobre o dano ao DNA induzido por FAL.

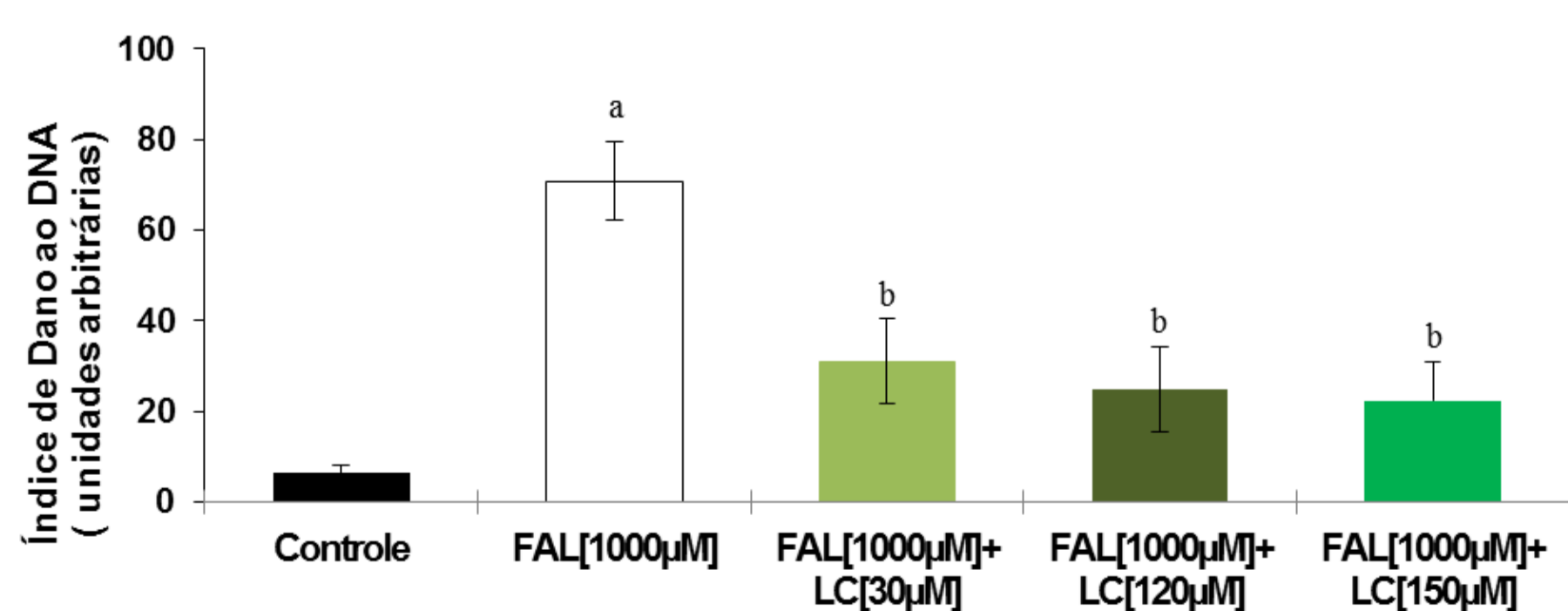
## METODOLOGIA

O efeito *in vitro* de diferentes concentrações de LC (30, 120 e 150  $\mu$ M) sobre o dano ao DNA induzido por FAL (1000  $\mu$ M) foi verificado nos leucócitos de 6 indivíduos normais através do ensaio cometa alcalino[10]. Os níveis urinários da 8-hidroxideoguanosina (8-OHdG), um biomarcador de dano oxidativo ao DNA, foi determinado por Kit ELISA de 8-OHdG altamente sensível, e foram medidos em 8 pacientes com PKU clássica (idade média de 16.6  $\pm$  3.85), sob terapia dietética e suplementados com uma fórmula especial por pelo menos 6 meses (de acordo com a idade: *PKU 2 Secunda* para indivíduos acima de 8 anos e *PKU 3 Advanta* para indivíduos acima de 15 anos – Support<sup>®</sup>) contendo LC (LC: 105 a 98 mg/dia, respectivamente) e nos indivíduos controle com idade e sexo semelhante aos dos pacientes. Os níveis de FAL e LC no sangue dos pacientes PKU foram determinados por espectrometria de massas em tandem [11].

O estudo foi conduzido de acordo com as recomendações do Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (projeto n.º 04-080 e 14-0180). Os pais de todos os pacientes e controles assinaram o termo de consentimento autorizando a participação nesta pesquisa.

Os autores declararam que não possuem interesse financeiro e/ou conflito de interesse associado a este trabalho.

## RESULTADOS



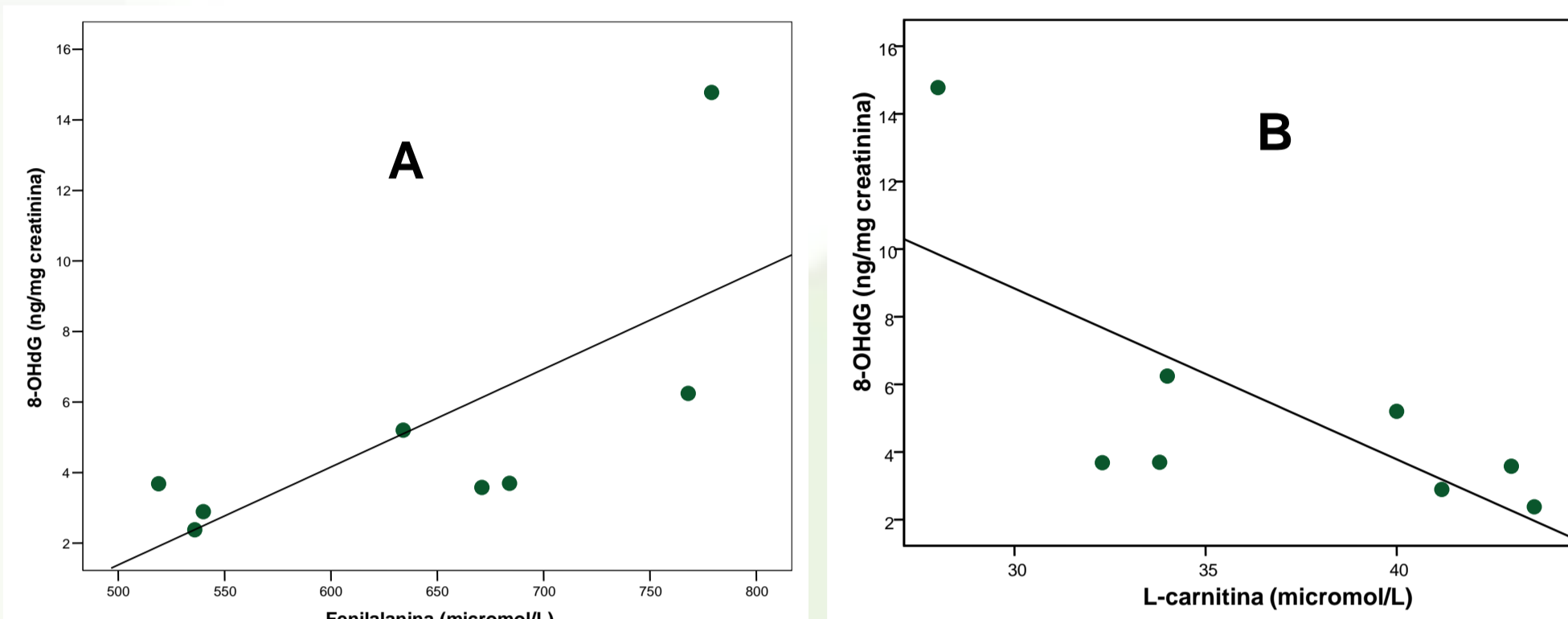
**Fig. 1** Efeito *in vitro* da LC (30, 120 e 150  $\mu$ M) no índice de dano ao DNA induzido por FAL (1000  $\mu$ M) em leucócitos de indivíduos normais. Dados expressos como média  $\pm$  EPM. Comparado ao grupo controle (controle negativo), a  $p < 0.05$ ; comparado ao grupo FAL (1000  $\mu$ M), b  $p < 0.05$  (ANOVA, seguido de Duncan test).

Este trabalho agradece o suporte financeiro de: CAPES, CNPq, FAPERGS e FIPE/HCPA.

**Tabela 1** Achados bioquímicos em controles vs pacientes PKU tratados.

	Controle (n=11-8)	PKU (n=8)	Valores de P
Fenilalanina ( $\mu$ mol/L)	26,69 $\pm$ 1,61	641,37 $\pm$ 36,37**	$P < 0,001$
LC ( $\mu$ mol/L)	34,12 $\pm$ 2,29	37,00 $\pm$ 2,04	NS
8-OHdG (ng/mg creatinina)	6,81 $\pm$ 0,81	5,30 $\pm$ 1,42	NS

Dados expressos como média  $\pm$  EPM. Diferença em relação ao controle, \*\*  $P < 0,001$  (Student t test não pareado). NS: Estatisticamente não significativo.



**Fig. 2** Correlações entre os níveis de 8-OHdG urinária e Fenilalanina plasmática (A) ( $r=0,712$ ;  $p < 0,05$ ) e L-carnitina (B) ( $r=-0,677$ ,  $p < 0,05$ ) nos pacientes PKU tratados (Correlação de Pearson).

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Vários estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo e o dano ao DNA desempenham um importante papel na patogenia e progressão da PKU[6-9]. Foi verificado o efeito *in vitro* da LC, uma substância antioxidante, no dano ao DNA induzido por FAL. A concentração de 1000  $\mu$ M, a qual pode ser encontrada em pacientes PKU, induziu dano ao DNA em leucócitos de indivíduos normais, e o co-tratamento com LC (30, 120 e 150  $\mu$ M) reduziram significativamente o dano ao DNA (56,35%, 64,94% e 68,47%, respectivamente). Ribas e colaboradores (2010) realizaram um estudo *in vitro* semelhante, onde foi observado que a LC em concentrações superiores a 60  $\mu$ M era capaz de reduzir o dano ao DNA induzido por ácidos orgânicos (ácidos propiônico e L-metilmalônico)[4]. Ainda, em nosso estudo foram avaliados os níveis urinários de 8-OHdG em pacientes com PKU sob dieta de restrição proteica suplementados com fórmula especial de aminoácidos (sem FAL) contendo LC. Foi verificada uma excreção urinária similar de 8-OHdG quando comparado indivíduos controle com pacientes PKU tratados. Este achado está de acordo com os resultados observados em nosso estudo sobre o efeito *in vitro* da LC sobre a redução de dano ao DNA induzido por FAL, e um tanto esperado uma vez que estes pacientes PKU foram suplementados com uma fórmula de aminoácidos que contém LC. Ainda, verificou-se que os níveis urinários de 8-OHdG, biomarcador de dano oxidativo ao DNA, nos pacientes PKU estavam correlacionados positivamente com os níveis sanguíneos de FAL e negativamente correlacionados com a concentração sanguínea de LC livre, reforçando que este nível de FAL está correlacionado com danos ao DNA [7,9], bem como o papel antioxidante da LC na PKU[3]. O presente estudo proporciona evidência experimental que a LC pode reduzir o dano ao DNA *in vitro* induzido pela FAL, assim como, permite supor que a LC protege contra o dano ao DNA em pacientes PKU.

## REFERÊNCIAS

- [1] Vaz, FM, Wanders RJ (2002) Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem J* 361:417-429
- [2] Ribas GS, Vargas CR, Wajner M (2014) L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders. *Gene* 533(2):469-476
- [3] Sitta A, Vanzin CS, Biancini GB, et al. (2011) Evidence that L-carnitine and selenium supplementation reduces oxidative stress in phenylketonuric patients. *Cell Mol Neurobiol* 31(3):429-436
- [4] Ribas GS, Manfredini V, de Marco MG, et al. (2010) Prevention by L-carnitine of DNA damage induced by propionic and L-methylmalonic acids in human peripheral leukocytes *in vitro*. *Mutat Res* 702(1):123-128
- [5] Scriver CR, Kaufman S (2001) Hyperphenylalaninemias: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8<sup>th</sup> ed., McGraw-Hill Inc., New York, chapter 77, pp. 1667-3301
- [6] Ribas GS, Sitta A, Wajner M, Vargas CR (2011) Oxidative stress in phenylketonuria: what is the evidence? *Cell Mol Neurobiol* 31(5):653-662
- [7] Schulpis KH, Tsakiris S, Traeger-Synodinos J, Papassotiriou I (2005) Low total antioxidant status is implicated with high 8-hydroxy-2-deoxyguanosine serum concentrations in phenylketonuria. *Clin Biochem* 38:239-242
- [8] Simon KR, Dos Santos RM, Scaini G, et al. (2013). DNA damage induced by phenylalanine and its analogue p-chlorophenylalanine in blood and brain of rats subjected to a model of hyperphenylalaninemia. *Biochem Cell Biol*. 91(5):319-24
- [9] Sitta A, Manfredini V, Biasi L, et al. (2009) Evidence that DNA damage is associated to phenylalanine blood levels in leukocytes from phenylketonuric patients. *Mutat Res* 679(1-2):13-16
- [10] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175(1):184-191
- [11] Chace DH, Hillman SL, Van Hove JLK, Naylor EW (1997) Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 43:2106-2113