

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica

PAPEL DO ÁCIDO LIPÓICO NA NEUROPROTEÇÃO CONTRA A TOXICIDADE DA
FENILALANINA

TARSILA BARROS MORAES

Orientador: Dr. Carlos Severo Dutra-Filho

Porto Alegre, 2009.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica

PAPEL DO ÁCIDO LIPÓICO NA NEUROPROTEÇÃO CONTRA A TOXICIDADE DA
FENILALANINA

TARSILA BARROS MORAES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Carlos Severo Dutra-Filho

Porto Alegre, 2009.

À minha mãe querida!

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus por sempre iluminar meu caminho e permanecer do meu lado mesmo nos momentos mais difíceis.

Quero agradecer também ao meu orientador por todos os momentos de paciência com minhas dúvidas e pela orientação neste trabalho e orientação profissional e pessoal.

Aos professores e alunos do grupo de Erros Inatos do Metabolismo pelas dicas sugestões nos seminários do grupo.

Ao Felipe Petrillo por todas as discussões calorosas a respeito do trabalho, da bioquímica e da vida. Com certeza sem o ânimo injetado constantemente por ele esse trabalho não seria o mesmo.

Gostaria de agradecer também a todos os amigos daqui, de Pelotas e Rio Grande que estavam sempre disponíveis para me colocarem pra cima e para me distraírem quando o trabalho se tornava um vício.

A Veridiana, minha irmã de coração, por esses dois anos me aturando e me dando todo o apoio necessário para continuar estudando em Porto Alegre.

Ao Sérgio que apesar de fazer parte da minha vida há pouco tempo, já é uma pessoa muito especial. Obrigada por também me fazer sentir especial e por ter agüentado tantas horas de estudo ao meu lado.

Aos homens da minha vida, pai, Everaldo e Jacques que sempre apoiaram e ajudaram nesses anos fora de casa.

A minha mãezinha que sempre acreditou em mim e sempre esteve do meu lado em todos os momentos me confortando e cuidando mesmo que longe e muitas vezes doente.

Amo-te!

Por último, mas com certeza mais importante, gostaria de agradecer as bolsistas de iniciação científica do laboratório 36, que sempre tiveram paciência e boa vontade para a realização dos experimentos e pelas excelentes sugestões dadas ao longo do trabalho. Obrigada a Fernanda, a Andréa, a Amanda e a Juliana, pois sem elas esse trabalho não teria sido possível.

Índice

Parte I

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
INTRODUÇÃO.....	11
1. Fenilcetonúria	11
1.1. Histórico	11
1.2. Metabolismo da Fenilalanina.....	11
1.3. Causas de hiperfenilalaninemias	12
1.4. Manifestação Clínicas.....	13
1.5. Diagnóstico	14
1.6. Tratamento.....	14
1.7. Alterações Bioquímicas e Neuropatológicas	15
1.8. Modelo Animal.....	17
2. Radicais Livres	18
2.1. Sistema de Defesa Antioxidante.....	19
2.2. Estresse Oxidativo	21
3. Estresse Oxidativo e Fenilcetonúria	22
4. Ácido Lipóico	24
OBJETIVOS.....	27

Parte II

CAPÍTULO I – Neuroprotection by lipoic acid in an acute hyperphenylalaninemia chemically-induced in rats.....	29
CAPÍTULO II – Resultados não incluídos em artigos	68

Parte III

DISCUSSÃO	75
CONCLUSÕES	82
PERSPECTIVAS	83
Referências Bibliográficas	84

Parte I

Resumo

A fenilcetonúria (PKU) é uma doença genética de caráter autossômico recessivo causada pela deficiência severa da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), que converte fenilalanina (Phe) em tirosina. O bloqueio desta reação resulta no acúmulo de fenilalanina e de seus metabolitos no plasma e tecidos (1 a 3 mM) e está relacionado com o retardo mental e convulsões apresentados pelos pacientes. A PKU é uma das mais frequentes e estudadas aminoacidopatias, porém a neurofisiopatologia da doença ainda é pouco conhecida. Estudos recentes tanto em pacientes quanto em animais mostraram que o estresse oxidativo pode estar envolvido na fisiopatologia da PKU devido ao acúmulo de metabólitos tóxicos, à excessiva produção de radicais livres e à influência de uma dieta restrita, que é o tratamento indicado para os pacientes fenilcetonúricos mas pode levar à carência de antioxidantes. O ácido lipóico (AL) é considerado um antioxidante ideal, pois interage com outros antioxidantes, induz expressão gênica e reage com espécies reativas específicas. Além disso, o AL pode ser adquirido na própria dieta e passa facilmente a barreira hematoencefálica, e por isso este composto vem sendo estudado no tratamento e prevenção de estresse oxidativo em diversas doenças neurodegenerativas. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos do AL sobre a toxicidade da Phe em parâmetros de estresse oxidativo como atividade das enzimas catalase (CAT); superóxido dismutase (SOD); glutatona peroxidase (GSH-Px) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), de tióis totais e de carbonilas formadas. Além disso, avaliar o potencial antioxidante total (TRAP) e a reatividade antioxidante total (TAR), a concentração de glutatona reduzida (GSH), o conteúdo de 2',7'-diclorofluoresceína formado (DCF) e a capacidade de eliminar radicais hidroxilas em cérebro de ratos jovens. Para isso foram realizados experimentos com pré-tratamento do AL *in vitro* e *in vivo* em um modelo experimental de PKU. Foi observado que o pré-tratamento proposto é eficaz para prevenir lipoperoxidação, diminuir as defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas, diminuir o conteúdo total de GSH e, ainda, prevenir o aumento de radicais gerados pelo acúmulo de Phe no tecido. Mais experimentos precisam ser realizados, porém se os resultados deste trabalho forem observados em pacientes é possível que uma dieta suplementada com AL possa contribuir para o tratamento da PKU.

Abstract

Phenylketonuria (PKU) is a genetic disease caused by autosomal recessive severe deficiency of phenylalanine hydroxylase (PAH), which converts phenylalanine (Phe) to tyrosine. The blocking of this reaction results in accumulation of phenylalanine and its metabolites in plasma and tissues (1 to 3 mM) and is linked to mental retardation and seizures in affected patients. PKU is one of the most frequent and studied inherited disorder, but the neuropathophysiology of the disease is still poorly known. Recent studies both in patients and in animals have shown that oxidative stress may be involved in the pathophysiology of PKU because of the accumulation of toxic metabolites, the overproduction of free radicals and the influence of a restricted diet, which is indicated for the treatment patients with PKU but may produce antioxidant deficiencies. Lipoic acid (LA) is considered an ideal antioxidant because it interacts with other antioxidants, induces gene expression and reacts with specific reactive species. Moreover, AL can be acquired in the diet and easily cross the blood brain barrier, and so this compound has been studied in the treatment and prevention of oxidative stress in several neurodegenerative diseases. The purpose of this study was to evaluate the effects of LA against the toxicity of Phe on oxidative stress parameters such as the activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), and the content of thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS), total thiol and carbonyl formed. Furthermore, to evaluate the total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR), the concentration of reduced glutathione (GSH), the content of 2',7'-dichlorofluorescein formed (DCF) and the ability to eliminate hydroxyl radical. So, experiments were performed with pre-treatment of AL *in vitro* and *in vivo* in brain of young rats subjected to a chemically-induced PKU. It was observed that the proposed pre-treatment is effective to prevent the increase of lipoperoxidation, the reduction of enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses (especially GSH), and also to prevent the increase of radicals generated by the accumulation of Phe in the tissue. More experiments need to be made, but if the results observed in this work were also seen in patients it is possible that a diet supplemented with AL may contribute to the current dietary treatment of PKU.

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT Catalase

DCF 2', 7' diclorofluoresceína

DCFH-DA 2', 7' diclorofluoresceína diacetato

DHPR Di-hidrobiopterina redutase

GR Glutaciona redutase

GSH Glutaciona reduzida

GSH-Px Glutaciona peroxidase

GSSG Glutaciona oxidada

G6PDH Glicose-6-fosfato desidrogenase

HPA Hiperfenilalaninemia

PHA Fenilalanina hidroxilase

Phe fenilalanina

PKU Fenilcetonúria

Q10 Ubiquinona-10

SNC Sistema Nervoso Central

SOD Superóxido dismutase

TAR Reatividade antioxidante total

TBA-RS Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TRAP Potencial antioxidante total

Introdução

1. Fenilcetonúria

A fenilcetonúria (PKU) é uma doença genética de caráter autossômico recessivo com incidência de aproximadamente 1:10.000 nascimentos na população caucasiana (Scriver e Kaufman, 2001). Sendo um dos mais freqüentes e estudados erros inatos do metabolismo de aminoácidos e causada pela deficiência severa da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), responsável pela conversão da L-fenilalanina em L-tirosina. Resultando, assim, no acúmulo de fenilalanina e de seus metabólitos no plasma e tecidos (1 a 3 mM), o qual está associado á disfunção neurológica e retardo mental observados nos pacientes (Scriver et al., 2001).

1.1. Histórico

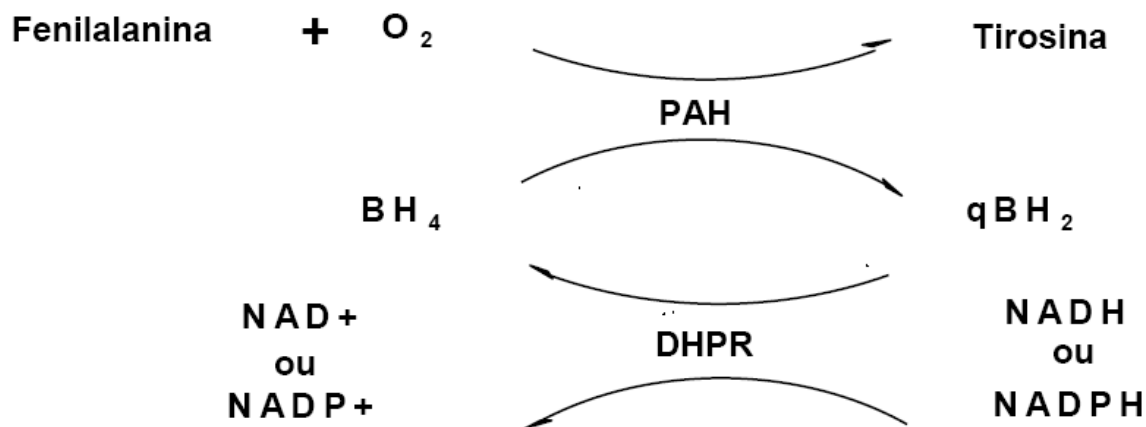
A fenilcetonúria foi descoberta por Folling, em 1934, através do teste de cloreto férrico, que reage com uma fenilcetona (ácido fenilpiruvico), formando um composto de cor verde. Folling analisou a urina de crianças com retardo mental e associou os sintomas neurológicos com a presença deste metabólito na urina (Nyhan, 1984; Centerwall e Centerwall, 2000). A doença passou a ser denominada fenilcetonúria por Penrose em 1935 e reconhecida como um erro inato do metabolismo (Scriver e Kaufman, 2001), mas Jervis (1947) identificou que a fenilalanina proveniente da dieta não era convertida à tirosina e a enzima deficiente (Williams et al., 2008).

1.2. Metabolismo da Fenilalanina

A L-fenilalanina é um aminoácido nutricionalmente essencial que é hidroxilado à tirosina pela fenilalanina hidroxilase hepática. Este primeiro passo do metabolismo da

fenilalanina requer a presença do cofator tetraidropteridina (BH₄) (Nyhan, 1984), o qual é regenerado pela di-hidropterina redutase (DHPR) com gasto de NADH ou NADPH (Scriver e Clow, 1980). A reação de hidroxilação da fenilalanina (Figura 1) envolve quantidades equimolares do aminoácido, BH₄ e oxigênio.

Por descarboxilação e transaminação, a fenilalanina é convertida à seus metabólitos (fenilpiruvato, fenilacetato e fenilactato) que são livremente excretados em indivíduos normais. O bloqueio da rota principal do catabolismo da fenilalanina provoca o acúmulo desses metabólitos nos tecidos dos pacientes afetados (Knox, 1972; Nyhan, 1984 e Scriver e Kaufman, 2001). O catabolismo da fenilalanina está representado pela figura 2.



PAH - Fenilalanina Hidroxilase

DHPR - Diidropteridina Redutase

Figura 1. Reação de hidroxilação da fenilalanina (Scriver e Clow, 1980).

1.3. Causas da Hiperfenilalaninemia

A hiperfenilalaninemia (HPA) é uma condição clínica em que os níveis plasmáticos de fenilalanina estão anormais, acima de $120\mu\text{M}$. As causas conhecidas da HPA são deficiências na atividade da fenilalanina hidroxilase e o bloqueio da síntese de BH_4 ou de sua regeneração. Entre as várias hiperfenilalaninemias descritas a fenilcetonúria corresponde àquelas mutações no gene que codifica a PAH (Scriver e Kaufman, 2001).

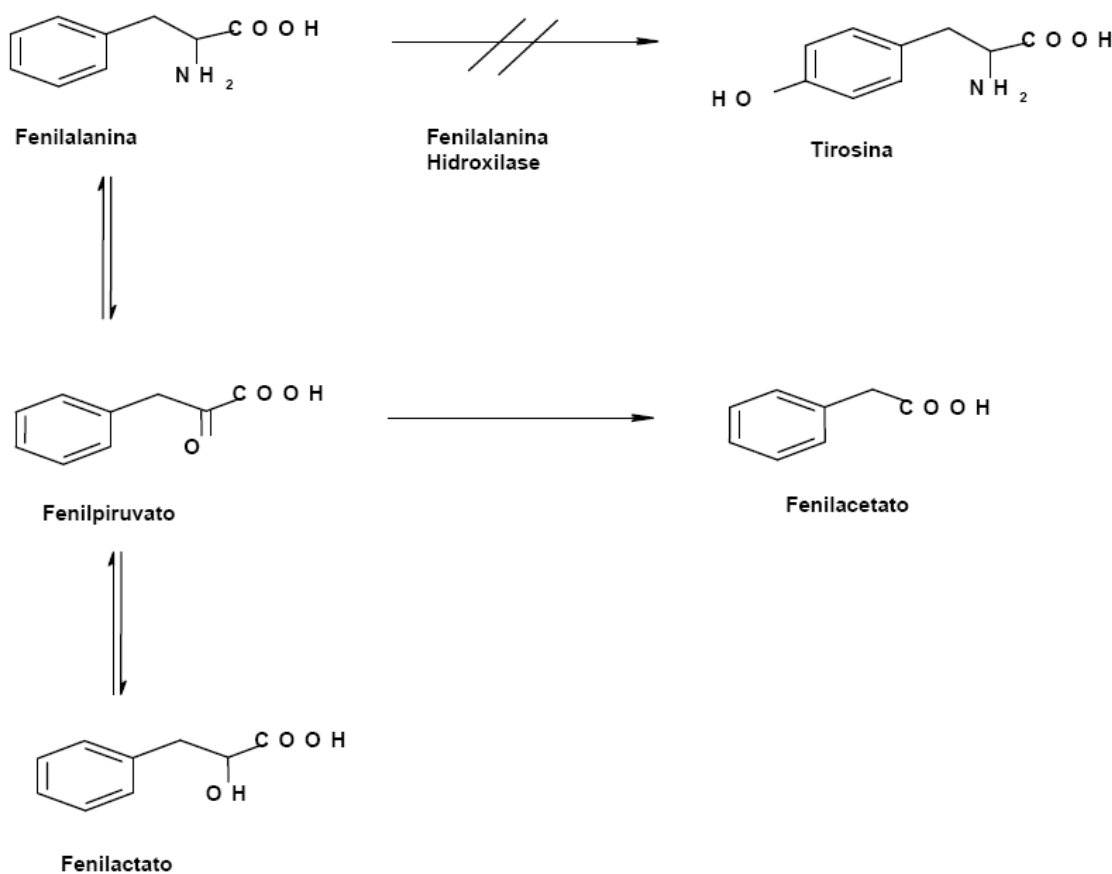


Figura 2. Catabolismo da fenilalanina (adaptado de Nyhan, 1984).

1.4. Manifestações Clínicas

Os fenilcetonúricos não-tratados apresentam sinais e sintomas que se manifestam em maior ou menor intensidade: alterações cutâneas, distúrbios de pigmentação, hipoplasia

dentária, descalcificação de ossos longos, atraso no desenvolvimento psicomotor, falha no sistema cognitivo, microcefalia, epilepsia, retardo no crescimento e convulsões (Nyhan, 1979; Nyhan, 1984; Pietz et al., 1993; Williams et al. 2008).

1.5. Diagnóstico

Na triagem neonatal a PKU pode ser identificada precocemente por diversos testes, incluindo o teste de inibição bacteriana em uma amostra de sangue coletada em papel filtro (Scriver e Kaufman, 2001), sendo posteriormente confirmada por métodos cromatográficos, fluorimétricos e enzimáticos (Clague e Thomas, 2002), além da espectrometria de massa (Pollitt, 2006 e Frazier et al., 2006). A importância de um diagnóstico já nos primeiros dias de vida é devido ao dano neurológico irreversível causado se os pacientes não forem tratados precocemente (Scriver e Kaufman, 2001; Kohli et al., 2005). É importante salientar que o diagnóstico fetal para a deficiência da PHA é também factível através da análise de DNA (Scriver e Kaufman, 2001, Desviat et al., 2006 e Rozak et al., 2006).

1.6. Tratamento

O tratamento para a PKU consiste principalmente de uma dieta hipoprotéica, restrita em fenilalanina, a fim de reduzir ou normalizar os níveis deste aminoácido, já que o grau de retardo mental está diretamente relacionado com a concentração elevada de Phe no plasma e tecidos dos pacientes afetados (Scriver e Kaufman, 2001).

Para os pacientes, alimentos como ovos, leite, pães, queijos e carne são proibidos. Entretanto a reposição protéica, necessária para o crescimento, é feita a partir de suplementos comerciais sem Phe (Williams et al., 2008). Os benefícios de uma dieta restrita em Phe são a melhora neuropsiquiátrica dos pacientes afetados e a prevenção do dano

neurológico (Zenam, 1996; Hanley, 2004). Porém, neste tipo de restrição alimentar é necessária uma suplementação vitamínica (Hvas, Nexø e Nielsen, 2006), além do acréscimo de ácidos graxos (Scriver e Kaufman, 2001; Santos et al., 2006; Agostini et al., 2006), visto que pacientes fenilcetonúricos sob tratamento dietético apresentam baixas concentrações de colesterol além de distúrbio no metabolismo de folato (Lucock et al., 2002; Schulpis et al., 2004).

Diversos estudos vêm sendo realizados, a fim de aprimorar o tratamento da fenilcetonúria, como a suplementação com BH_4 , eficiente em alguns casos na redução dos níveis plasmáticos de fenilalanina (Trefz et al., 2005; Santos et al., 2006) e a utilização via oral da enzima fenilalanina amônia-liase, que degrada a fenilalanina no trato digestivo, evitando a sua absorção (Sarkissian e Gámez, 2005). Além disso, a reposição enzimática através de enzimas recombinantes de PAH (Gámez et al., 2004) e a terapia gênica, na qual o gene inativo para a PAH na doença é substituído por um funcional com associação a um adenovírus (Oh et al., 2004; Chen e Woo, 2005; Harding, 2006), são novas estratégias sugeridas no tratamento da PKU.

1.7. Alterações bioquímicas e neuropatológicas

Mesmo com o tratamento dietético controlado os níveis teciduais de Phe nos pacientes são de 3 a 7 vezes superior ao dos indivíduos normais. Além disso, a deficiência em vitaminas e lipídeos da dieta restrita no tratamento desses pacientes são mecanismos que podem estar relacionados com as alterações clínicas e bioquímicas descritas a seguir.

As concentrações elevadas de fenilalanina e seus metabólitos geram, diretamente, toxicidade no sistema nervoso central (SNC), já que indivíduos que não seguem o

tratamento não restauram os níveis normais de Phe como aqueles que o seguem (Scriver et al., 2001; Surtees et al., 2000).

O sistema transportador de aminoácidos neutros na barreira hemato-encefálica é a via utilizada tanto pela Phe como valina, isoleucina, leucina, treonina, histidina, triptofano, metionina e tirosina (Pardridge, 1998). Assim, há uma competição direta desses aminoácidos com Phe quando este está em excesso, gerando uma redução nos níveis cerebrais, principalmente, de tirosina e triptofano (Hommes, 1989; Pietz et al., 1999; Burlina et al., 2000). A diminuição na captação desses dois aminoácidos causa distúrbios nas vias dopaminérgicas e serotoninérgicas, respectivamente. O desequilíbrio intracelular dos aminoácidos neutros, como consequência dos elevados níveis de L-fenilalanina, provoca síntese de proteínas irregulares e alterações no sistema de mielinização (Berger, 1980; Surtees et al., 2000).

Exames *post mortem* realizados em cérebro de indivíduos fenilcetonúricos revelaram redução na massa cerebral (Alvord et al., 1950), retração nas ramificações dendríticas das células piramidais e redução de espinhas dendríticas no córtex (Bauman e Kemper, 1982), alterações na substância branca (Shah, Peterson e McKean, 1972) e menor quantidade de lipídios associados à mielina (Tourian e Sidbury, 1983). Os níveis séricos da proteína S-100B, um marcador de lesões no SNC, foram correlacionados positivamente com os níveis sanguíneos de fenilalanina em pacientes PKU (Schulpis, Kariyannis e Papassotiriou, 2004).

A redução de mielina é amplamente documentada em pacientes não tratados e em modelos animais da doença (Shah, Peterson e Mc Kean, 1972; Berger, Springer e Hommes, 1980; Hommes, Eller e Taylor, 1982; Taylor e Hommes, 1983).

Em trabalhos anteriores, realizados em nosso grupo de pesquisa, foi utilizado um modelo animal de hiperfenilalaninemia através da administração de fenilalanina e α -metilfenilalanina, um inibidor da fenilalanina hidroxilase hepática (Greengard, Yoss e Delvalle, 1976). Ratos previamente tratados apresentaram uma redução na atividade da Na^+, K^+ -ATPase de membrana plasmática sináptica (Wyse et al., 1995), aumento das atividades da piruvatoquinase (Wannmacher, 1995) e da ATPdifosfohidrolase de sinaptossomas de córtex cerebral (Wyse et al., 1994). Por outro lado, estudos *in vitro* demonstraram que a fenilalanina tem um efeito inibitório sobre a atividade destas duas últimas enzimas, o que pode representar um aumento da síntese destas após o tratamento em resposta à inibição de suas atividades causada pela fenilalanina. Em 2001, Bedin e colaboradores demonstraram que a atividade da Na^+, K^+ -ATPase também está reduzida em membrana de eritrócitos de pacientes PKU. Utilizando este mesmo modelo químico experimental, Costabeber e colaboradores (2003) demonstraram que a fenilalanina inibe a atividade da enzima creatina quinase *in vitro* e reduz a atividade da enzima *in vivo*.

1.8. Modelo Animal

O modelo animal utilizado já estava estabelecido pelo grupo de pesquisa em Erros Inatos do Metabolismo desta instituição (Wannmacher et al., 1995; Wyse et al., 1995) e está baseado no modelo desenvolvido por Greengard et al. (1976). Através da administração de L-fenilalanina e de α -metilfenilalanina (inibidor da PAH) em doses descritas nos trabalhos citados, este modelo experimental químico foi capaz de reproduzir quimicamente, em ratos, níveis de Phe cerebrais semelhantes aos encontrados na fenilcetonúria em seres humanos.

Para este modelo ratos Wistar são apropriados, pois o desenvolvimento diário do sistema nervoso do rato é equivalente ao que ocorre a cada mês no ser humano (Clark et al., 1993), atingindo o desenvolvimento cerebral equivalente ao recém nascido humano, entre o 6º e o 8º dia de vida pós-natal (Hommes, 1982). Ainda que os modelos químicos experimentais com animais não correspondam exatamente à doença humana, permitem reproduzir alterações metabólicas específicas semelhantes às encontradas nos erros inatos do metabolismo, sendo, portanto, úteis para o estudo de suas repercussões, como o entendimento da fisiopatologia da doença e a avaliação de medidas terapêuticas a serem propostas para os pacientes.

2. Radicais Livres

O termo radical livre refere-se a átomo ou molécula que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, conferindo-lhe alta reatividade (Ferreira e Matsubara, 1997). Os radicais livres podem ser formados pela perda ou pelo ganho de um elétron de um não-radical (Halliwell e Gutteridge, 2007). Nas reações em cadeia induzidas pelos radicais livres, um radical reativo leva à formação de um produto que também é um radical livre e que, por sua vez, reage produzindo um terceiro radical. Tais reações podem ser divididas em reações de iniciação, propagação e de terminação (Boveris, 1998).

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o oxigênio molecular sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água. Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila ($HO_2^{\cdot-}$) e hidroxila (OH^{\cdot}), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em pequenas quantidades na mitocôndria junto à cadeia respiratória (Cohen, 1989). O termo genérico espécies reativas de oxigênio (ERO) é usado para incluir não só os

radicais livres, mas também alguns não-radicais derivados do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso (HOCl) e o ozônio (O_3) (Halliwell e Gutteridge, 2007). Essas espécies reativas de oxigênio estão presentes tanto em processos fisiológicos normais quanto patológicos do organismo, mas mecanismos eficientes para sua destoxificação se desenvolvem naturalmente. Apenas um desequilíbrio entre os sistemas de produção e os de remoção dessas espécies é que pode resultar em consequências patológicas (Bergendi et al., 1999), no qual as EROs podem oxidar moléculas como proteínas, lipídios e DNA (Halliwell e Whiteman, 2004).

2.1. Sistema de defesa antioxidante

Os seres vivos dispõem de mecanismos protetores para retardar e/ou prevenir o acúmulo de espécies reativas e seus efeitos deletérios. Os sistemas de defesa conservam a harmonia entre a produção fisiológica de ERO e sua destoxificação (Halliwell e Gutteridge, 2007; Behl e Moosmann, 2002), sendo classificados em enzimáticos e não-enzimáticos. Entre as enzimas antioxidantes podemos citar a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GSH-Px). Já nas defesas não-enzimáticas os antioxidantes lipofílicos (tocoferóis, carotenóides e bioflavonóides) e hidrofílicos (glutathiona, ácido ascórbico, indóis e catecóis) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A SOD catalisa a reação de dismutação de dois radicais superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio e é chamada de defesa primária contra o estresse oxidativo, já que o radical superóxido é um forte iniciador de reações em cadeia (Marks, Marks e Smith, 1996). O peróxido de hidrogênio formado é menos reativo que o radical superóxido e é degradado posteriormente por outros sistemas, como a catalase e glutathiona peroxidase (Fridovich, 1975). Existem três formas de SOD com diferentes grupos prostéticos em sua

composição. A forma SOD cobre-zinco está presente principalmente no citosol em praticamente todas as células eucarióticas, a SOD manganês na matriz mitocondrial, enquanto a SOD ferro em plantas e bactérias (Mc Cord e Fridovich, 1969; Fridovich, 1975).

Já a CAT é uma hemoproteína que catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio (Ferreira e Matsubara, 1997). Ela está localizada principalmente no peroxissoma e em menor quantidade no citosol e na fração mitocondrial da célula (Marks, Marks e Smith, 1996).

A GSH-Px catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos para seus álcoois correspondentes (Ferreira e Matsubara, 1997). O grupo sulfidril da glutathiona reduzida (GSH) atua como doador de elétrons e é oxidado para a forma glutathiona oxidada (GSSG). Há dois tipos de glutathiona peroxidase: uma requer seleniocisteína (Prohaska et al., 1977) como cofator, podendo ser encontrada no citosol e na mitocôndria, e outra que é independente de selênio e localiza-se no citosol (Marks, Marks e Smith, 1996). A GSH-Px atua acoplada à enzima glutathiona redutase (GR), que catalisa a redução de GSSG. Esta redução requer NADPH como coenzima (Marks, Marks e Smith, 1996).

A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo sintetizado a partir de L-glutamato, L-cisteína e glicina (Sies, 1999). A capacidade redutora da GSH é determinada pela presença do grupamento tiólico (-SH) da cisteína. Na maioria das células, a GSH é encontrada em elevadas concentrações (mM) no meio intracelular e atua como transportadora e reservatório de cisteína, além de participar da destoxificação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e produtos de lipoperoxidação. A GSH também é requerida para a

síntese de DNA, proteínas e algumas prostaglandinas (Halliwell e Gutteridge, 2007) e tem papel na transdução de sinal, na expressão gênica e apoptose (Sies, 1999).

2.2. Estresse Oxidativo

Em situações normais (organismos sadios), a produção de espécies ativas de oxigênio e de nitrogênio, além de outros oxidantes, é balanceada pelos sistemas de defesa de antioxidantes do organismo.

Estresse oxidativo refere-se à inadequada oxidação de biomoléculas levando a um dano celular, através das espécies reativas (Behl e Moosmann, 2002), ou seja, ocorre uma situação de desequilíbrio entre a produção de oxidantes e as defesas antioxidantes (Halliwell e Whiteman, 2004; Salvador e Henriques, 2004).

O dano biomolecular pode ser causado pelo ataque direto de espécies reativas durante o estresse oxidativo, o qual pode ter como conseqüências: adaptação das células por up-regulation, injúria celular ou morte celular por apoptose ou necrose (Halliwell e Whiteman, 2004).

As conseqüências danosas do estresse oxidativo têm sido envolvidas em uma variedade de doenças humanas, incluindo arteriosclerose e desordens do SNC. O sistema nervoso parece ser especialmente sensível à oxidação. Dano oxidativo em células nervosas tem sido encontrado em um grande número de desordens neurodegenerativas (Behl e Moosmann, 2002).

Todos os organismos aeróbios estão expostos ao dano oxidativo. O tecido nervoso é o mais suscetível comparando com outros, devido ao alto consumo de oxigênio pelo cérebro (Halliwell e Gutteridge, 2007), a grande quantidade de lipídios insaturados na sua composição, deficiência nos mecanismos de proteção contra as ERO e concentrações

elevadas de ferro que favorecem a lipoperoxidação em determinadas áreas cerebrais. Além disso, a morte celular ou a alteração do gradiente iônico normal podem aumentar a liberação de glutamato, levando ao aumento excessivo de Ca_2^+ livre intracelular e Na^+ em neurônios adjacentes resultando em alta produção de $\text{NO}\cdot$ e ERO.

3. Estresse Oxidativo e Fenilcetonúria

O estresse oxidativo tem sido sugerido como um participante na fisiopatologia de alguns erros inatos do metabolismo devido ao acúmulo de metabólitos tóxicos que podem levar à excessiva produção de radicais livres e/ou à diminuição das defesas antioxidantes (Wajner et al., 2004). Além disso, a terapia de dietas restritivas também pode alterar o status antioxidante dos pacientes contribuindo para o aumento de estresse oxidativo nestes pacientes (Artuch et al., 2004).

Alguns estudos mostraram que pacientes com PKU sob dieta restrita em fenilalanina apresentavam baixos níveis de selênio eritrocitário e baixa atividade da GSH-Px sem apresentar sintomas sugestivos de deficiência de selênio (Wilke et al., 1992; Lombeck, Jochum e Terwolbeck, 1996). Wilke e colaboradores (1992) também demonstraram que essas deficiências estão associadas com aumento da lipoperoxidação, através da avaliação de produtos como o malondialdeído no plasma. E ainda, que após a suplementação com selênio, oligoelementos e vitaminas, crianças com PKU ou com hiperfenilalaninemia leve apresentaram níveis normais da atividade da GSH-Px. Distúrbios neurológicos foram mais freqüentemente observados em pacientes com PKU com baixa atividade da GSH-Px do que em pacientes com atividade normal da enzima (Sierra et al., 1998).

Artuch e colaboradores (2004) investigando três fatores do sistema antioxidante em relação ao dano oxidativo em pacientes PKU (selênio, ubiquinona-10 (Q10) e atividades de

enzimas antioxidantes) concluíram que o status de selênio não é afetado em pacientes sob dieta. Os autores concluíram também que os níveis de Q10 tendem a diminuir com a idade do paciente e que a atividade da enzima catalase foi negativamente associada aos níveis plasmáticos de fenilalanina.

Longhi e colaboradores (1987) confirmaram observações prévias de como a deficiência de micronutrientes pode ser prejudicial e como é alto o risco dessa deficiência em pacientes fenilcetonúricos. Recentemente, Gropper e colaboradores (2004) demonstraram que a hiperfenilalaninemia altera o metabolismo do ferro, cobre e zinco em ratos com PKU.

Em 1997, Moyano e colaboradores demonstraram a extensão do dano oxidativo causado por vários erros inatos do metabolismo através da medida de tocoferol. Os níveis deste antioxidante foram especialmente baixos em pacientes não tratados com erros inatos do metabolismo energético. Adolescentes que abandonaram o tratamento apresentaram níveis de tocoferol no limite mínimo da taxa normal e após o tratamento com este antioxidante a deficiência foi corrigida nas doenças estudadas sendo, então, recomendado o uso deste antioxidante monitorado bioquimicamente.

Martinez-Cruz e colaboradores (2002) demonstraram aumento de alguns marcadores de estresse oxidativo e indução significativa de dano morfológico em cérebro e cerebelo de filhotes de ratos fenilcetonúricos. Além disso, demonstraram que melatonina e outros antioxidantes são capazes de reverter completamente o dano induzido pela PKU nestes animais.

Em trabalho realizado pelo nosso grupo foi demonstrado que a fenilalanina aumenta a quimiluminescência e reduz o potencial antioxidante total em amostras de cérebro de ratos *in vitro* e *in vivo*. A mesma ainda inibiu a atividade da enzima catalase *in vitro* e *in*

vivo e reduz a atividade da GSH-Px *in vivo* (Hagen et al., 2002). Estes são fortes indícios de que o estresse oxidativo faz parte da neuropatologia da PKU.

Colome e colaboradores (2002) demonstraram que a concentração de Q10 está diminuída em linfócitos de pacientes fenilcetonúricos e, que esta deficiência está associada à alta concentração plasmática de fenilalanina. Posteriormente, este mesmo grupo avaliou a relação entre a baixa concentração sérica de Q10 e outros antioxidantes lipofílicos, concluindo que a lipoperoxidação parece estar envolvida na doença (Colome et al., 2003).

Em estudo recente de pacientes fenilcetonúricos, foi demonstrado, através da avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em eritrócitos e plasma, que estes pacientes apresentam estimulação da lipoperoxidação, deficiência na capacidade antioxidante e diminuição da atividade da GSH-Px (Sirtori et al., 2005; Sitta et al., 2006), além de um aumento da produção de espécies reativas (Sirtori et al., 2005). Também em 2005, Schulpis e colaboradores demonstraram que uma alta concentração de fenilalanina e uma diminuição no status antioxidante total plasmático de pacientes com uma “dieta frouxa” pode induzir a oxidação de DNA, evidenciada pela medida dos altos níveis de 8-hidróxi-2-deoxiguanosina, a qual pode ser utilizada como marcador de aumento de risco de processos neurodegenerativos.

4. Ácido Lipóico

O ácido lipóico (AL) ou ácido 1,2-ditiolano-3-pentanóico, também é conhecido como ácido tióico e lipoamida, é encontrado naturalmente na mitocôndria participando do ciclo de Krebs como cofator para as enzimas piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase (Sumathi et al., 1996; Hagen et al., 1999). Antes do isolamento desta

molécula, o AL fora descrito como uma vitamina, atualmente sabe-se que ele é sintetizado por animais e plantas (Carreu, 1979; Sumathi et al., 1996; D'Amico et al., 2004).

Diversos alimentos contem ácido lipóico, os mais ricos são o espinafre, o brocolis e o tomate (Lodge et al., 1997). Uma vez absorvido da dieta, o AL é transportado para dentro das células onde é reduzido á ácido diidrolipoico (ADHL) no citoplasma pela enzima glutationa redutase e na mitocôndria pela enzima diidrolipoamida desidrogenase (Packer et al., 1997; Moini, Packer e Saris, 2002), podendo ser reoxidado pela lipoamida desidrogenase (Biewenga et al., 1997). Segundo Packer e colaboradores (1995) de 21% a 45% do total de ácido lipóico é reduzido a ácido diidrolipoico.

Devido à fácil ingestão do ácido lipóico através da alimentação diária e sua rápida absorção pelo organismo, o AL vem sendo utilizado em diversos modelos animais como tratamento e prevenção de estresse oxidativo em patologias, como Alzheimer e Parkinson (Packer et al., 1997); isquemia-reperfusão (Roy et al., 1997), diabetes (Ziegler et al., 1999); SIDA (Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida) (Fuchs et al., 1993) e até para o envelhecimento (Arivazhagan e Panneerselvam, 2000).

Como o ácido tíico é uma molécula pequena, lipo e hidrossolúvel, pode atravessar facilmente as membranas celulares, incluindo a barreira hematoencefálica (Seaton et al., 1996; Samuel et al., 2005; Muthuswamy et al., 2006). Sua importância metabólica já é conhecida há muitos anos, mas somente recentemente esta substância está sendo reconhecida como um poderoso antioxidante. Tanto a forma oxidada quanto a reduzida do ácido lipóico aproximam-se muito do ideal como antioxidante, apresentando especificidade na eliminação de radicais livres, induzindo a expressão de genes importantes na defesa antioxidante, quelando metais e interagindo com outros antioxidantes, incluindo a GSH (Packer et al., 1995).

O uso de ácido lipóico como agente terapêutico em erros inatos do metabolismo não é muito descrito na literatura científica, mas alguns trabalhos mostram uma melhora intelectual e neuropsicomotora em pacientes diariamente suplementados com AL para doenças do metabolismo do piruvato (Hommes et al., 1968; Blass, 1983; Matalon et al., 1984).

Objetivo Geral

Avaliar o papel do ácido lipóico sobre o estresse oxidativo gerado pela fenilalanina em cérebro de ratos jovens.

Objetivos Específicos

- 1) Investigar o efeito do pré-tratamento com ácido lipóico em cérebro de ratos submetidos a um modelo agudo experimental de hiperfenilalaninemia.

- 2) Avaliar o efeito neuroprotetor do ácido lipóico *in vitro* contra uma concentração tóxica de fenilalanina.

Parte II

Capítulo I

“NEUROPROTECTION BY LIPOIC ACID IN AN ACUTE
HYPERPHENYLALANINEMIA CHEMICALLY-INDUCED IN RATS”

Tarsila Barros Moraes, Fernanda Zanin, Andrea da Rosa, Amanda de Oliveira, Juliana
Coelho, Felipe Petrillo, Moacir Wajner, Clóvis Wannmacher, Angela Wyse, Carlos Severo
Dutra-Filho.

Artigo a ser submetido à revista Neuroscience Letters.

Abstract

Although phenylketonuria (PKU) and hyperphenylalaninemia (HPA) are the most important inherited metabolic disorders of amino acids, the mechanisms of brain damage are poorly understood. These disorders lead to the accumulation of L-Phenylalanine (Phe) in the tissues and plasma of patients. The main clinical features are retarded development and intellectual impairment. Recent studies show that oxidative stress may be involved in neuropathology of PKU. Lipoic acid (LA) is considered a potent antioxidant and has been reported as an important therapeutic agent. This compound is well absorbed from diet and can cross the blood-brain barrier easily. In this work, was investigated the neuroprotective effects of a pretreatment with lipoic acid in a hyperphenylalaninemia animal model. Wistar rats from 11 to 13 days of life were subject to subcutaneous injections of α -methyl-phenylalanine plus Phe with or without LA pretreatment while control group received saline. The pretreatment of LA prevented the inhibition provoked by Phe in activity of antioxidant enzymes, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). And also, it prevented Phe effects on total radical-trapping antioxidant potencial (TRAP), thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS), glutathione concentration (GSH) and 2',7'-dichlorofluorescein techniques. We can conclude that LA can be an efficient antioxidant substance in the CNS against oxidative stress induced in a hyperphenylalaninemia animal model. If these results were observed in patients, it is possible that supplementation of lipoic acid in the diet may contribute to the treatment of the PKU as an additional therapeutic approach to the Phe-restricted dietary treatment.

Keywords: Phenylalanine; hyperphenylalaninemia; lipoic acid; oxidative stress

Introduction

Phenylketonuria (PKU) and hyperphenylalaninemias (HPA) are recessive autosomal disorder caused by a severe deficiency of phenylalanine-4-hydroxylase (PAH) activity, a hepatic enzyme which converts L-phenylalanine (Phe) to L-tyrosine (Tyr), leading to the accumulation of Phe and metabolites in tissues and biological fluids. The high concentration of these substances seems to be toxic to the organism and to be involved in neuropathophysiology features of the disease which are growth failure, microcephaly, seizures and intellectual impairment (Scriver and Kaufman, 2001). Besides, the lack of tyrosine may cause disturbs on neurotransmitters production as dopamine and noradrenaline (Curtis et al., 1981). The mainly treatment required is a phe-restricted diet which consist of a restriction of protein-rich foods and a amino acids commercial supplementation without Phe (Start, 1998; Burgard, 2000). The early diagnostic done in a neonatal screening and a promptly treatment implementation is necessary to avoid mental retardation provoked by phe-accumulating (Burgard, 2000).

Recently, both animal and patient studies have been shown the possible involvement of oxidative stress in pathophysiology of inborn errors of metabolism (Colomé et al., 2000; Wajner et al, 2004). In hyperphenylalaninemia, oxidative stress might be involved due to the toxicity generated by the accumulation of Phe, since it can lead to a free radicals overproduction and/or reduction in antioxidant status in disease (Sierra et al., 1998; Artuch et al., 2004; Colomé et al., 2007). High levels of Phe are capable to inhibit directly antioxidant enzymes activity as catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px), increase lipid peroxidation and reduce the total reactive antioxidant potential (TRAP) *in vitro* and in hyperphenylalaninemia-induced rats (Hagen et al., 2002). Similar effects were also observed in plasma and erythrocytes of phenylketonuric individuals (Sirtori et al.,

2005; Sitta et al., 2006; Sitta et al., 2009). Furthermore, the restricted diet required for the treatment of these patients may also alter their antioxidant status (Van Bakel et al., 2000; Schulpis et al., 2005). Martinez-Cruz et al. (2002) also reported the involvement of oxidative stress including morphological damage induced in phenylketonuric rats and the reverted effect by antioxidants.

Free radicals are produced naturally in organism, but the excess of these compounds caused by the overproduction and/or the diminished in antioxidants defenses lead to disturbances as enzymatic system defects, difficult membrane transport, mutations or other, as a result of protein, lipids and DNA damage (Halliwell and Gutteridge, 2007). Lipoic acid (LA) is synthesized in animal and vegetable tissues acting as a cofactor to Krebs cycle enzymes (Sumathi et al., 1996; Hagen et al., 1999; Moini et al., 2002), but levels of its free form in animal tissues are very low and it is not considered a suitable endogenous antioxidant (Halliwell and Gutteridge, 2007). So, the main sources of LA are green vegetables (Lodge et al., 1997) and it is rapidly absorbed from the diet, transported to cells and reduced to dihydrolipoic acid (DHLA) (Packer et al., 1997). These compounds have very low molecular weight and can easily pass through the blood-brain barrier (Samuel et al., 2005). Both lipoic acid and dihydrolipoic acid are potent antioxidants capable of scavenging free radicals, inducing antioxidant enzyme expression and chelating metals (Packer et al., 1997) and have been suggested in treatment and to prevent oxidative stress in many experimental models, such as Alzheimer and Parkinson diseases (Packer et al., 1997), ischemia-reperfusion injury (Roy et al., 1997), diabetes (Ziegler et al., 1999), AIDS (Fuchs et al., 1993), and ageing (Arivazhagan e Panneerselvam, 2000).

Some studies have suggested improvement on intellectual and motor performance of patients supplemented daily with lipoic acid in disorders of pyruvate metabolism (Hommes et al., 1968; Blass, 1983; Matalon et al., 1984). Therefore, the objective of this study was to investigate neuroprotective effects of lipoic acid pretreatment in a hyperphenylalaninemia-induced model.

Materials e Methods

Reagents and equipments

All chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). A double-beam spectrophotometer with temperature control (Hitachi U-2001), Wallac 1409 Scintillation Counter and Spectra max Gemini xps fluorometer were used for the measurements. Eppendorf 5417R (refrigerated version) and Eppendorf 5403 were used for the centrifugation procedures.

Animals

Eleven to thirteen days-old Wistar rats bred in the Department of Biochemistry, ICBS, UFRGS, were used. Rats were kept with dams until they were sacrificed. The dams had free access to water and 20% (w/w) protein commercial chow (Supra, Porto Alegre, RS, Brazil). They were maintained in a room with a 12:12 h light/dark cycle (lights on 7:00-19:00 h) and with air conditioned controlled temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). The “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication # 80-23, revised 1996) were followed throughout the experiments.

Experimental Design

The treatment was performed for three days and 5 to 7 days life Wistar rats were divided in four groups. Control group, received saline solution each day. LA group received 100mg/Kg lipoic acid each day. Phenyl group received saline at the first day, 1.6 $\mu\text{mol/g}$ α -methylphenylalanine (α -MePhe, a phenylalanine hydroxylase inhibitor) at the second day and 2.1 $\mu\text{mol/g}$ L-phenylalanine at the third day. Phenyl+LA group received 100mg/Kg lipoic acid at the first day, 1.6 $\mu\text{mol/g}$ α -MePhe and 100mg/Kg LA at the second, and received 2.1 $\mu\text{mol/g}$ phenylalanine and 100mg/Kg LA at the third day. Solutions were prepared each day and were administered by subcutaneous injections according to Hagen et al. (2002).

In vitro experiments

Homogenates were divided into four groups: control, LA, Phe and Phe+LA. The experimental design consisted of a pre-incubation and of an incubation of 1 hour each at 37°C. In the pre-incubation, 0.1 mM LA was added to LA and Phe+LA groups while distilled water was added in control and Phe groups. After 1 hour, 20 mM L-phenylalanine was added to Phe and Phe+LA groups while distilled water was added in control and LA groups.

Tissue Preparation

One hour after the last injection, animals were killed by decapitation without anesthesia and the brain was immediately removed. The olfactory bulbs, cerebellum and pons/medulla were discarded. The rest of the brain (forebrain or cerebrum) was weighed and kept chilled until homogenization. The brain was homogenized 1:10 w/v in 20 mM sodium phosphate and 140 mM KCl (pH 7.4) buffer and centrifuged at 1000g for 10 min at 4°C, and the supernatant was immediately used for measurements.

Catalase assay

CAT activity was assayed using a double-beam spectrophotometer with temperature control (Hitachi U-2001). This method is based on the disappearance of H₂O₂ at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H₂O₂, 0.1% Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.0, and 0.1-0.3 mg protein/mL (Aebi, 1984). One CAT unit is defined as one μ mol of hydrogen peroxide consumed per minute and the specific activity is calculated as CAT units/mg protein.

Superoxide dismutase assay

SOD activity was determined according to Marklund (1985) based on pyrogallol autoxidation. At 420 nm pyrogallol oxidation is analyzed per min in a mix with 50 mM Tris-HCl 1mM EDTA pH 8.2 buffer, 30 μ M catalase, homogenate and 24 mM pyrogallol. A 50% inhibition is defined as unit of SOD and the specific activity is calculated as SOD units/mg protein.

Glutathione peroxidase assay

GSH-Px activity was measured using tert-butyl-hydroperoxide as substrate (Wendel, 1981). NADPH disappearance was monitored at 340 nm using a double-beam spectrophotometer with temperature control (Hitachi U-2001). The medium contained 2 mM glutathione, 0.15 U/mL glutathione reductase, 0.4 mM azide, 0.5 mM tert-butyl-hydroperoxide and 0.1 mM NADPH. One GSH-Px unit is defined as one μ mol of NADPH consumed per minute and the specific activity is represented as GSH-Px units/mg protein.

Glucose-6-phosphate dehydrogenase assay

Glucose-6-phosphate dehydrogenase was measured by the method of Leong and Clark (1984), in which the reaction mixture (1 mL) contained: 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM NADP⁺, and sample. The reaction was started by the addition of 1 mM glucose-6-phosphate and was followed in a spectrophotometer at 340 nm. One G6PDH unit corresponds to 1 μmol of substrate transformed per min and the specific activity is represented as units per mg protein.

Total radical-trapping antioxidant potential (TRAP)

TRAP was determined by measuring the chemiluminescence intensity of luminol induced by ABAP thermolysis (free radical source) in a scintillation counter (Lissi et al., 1992; Evelson et al., 2001). After adding 3 mL of 10 mM ABAP and 10 μL of 5.6 mM luminol to scintillation vials, the initial light intensity was obtained. Ten μL of 160 μM Trolox (water-soluble α-tocopherol analogue) or 30 μL of samples were added to assess their antioxidant content and at this point, the luminescence intensity is practically abolished. The consumption of active antioxidants present in samples produces the return of the luminescence and the time required to this was compared to those obtained employing Trolox under identical experimental conditions. TRAP values were calculated as Trolox equivalents and were represented as nmol Trolox/mg protein.

Reduced glutathione (GSH) content

This method is based on the reaction of GSH with the fluorophore o-phthalaldehyde (OPT) after deproteinizing the samples, and was measured according to Browne and Armstrong

(1998). Initially, metaphosphoric acid was used to deproteinize the samples, which were then centrifuged at 1000 g for 10 min. Briefly, to 100 μ L of each supernatant were added 2 mL of sodium phosphate buffer pH 8.0 and 100 μ L OPT 1 mg/mL (prepared in metanol). The mixture was vortexed and allowed to stand in the dark for exactly 15 minutes. After that, the fluorescence was measured at λ_{em} = 420 nm and λ_{ex} = 350 nm. A calibration curve was also performed with a commercial GSH solution, and the results were expressed as μ mol GSH/mg protein.

Thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS)

TBA-RS was measured according to Ohkawa et al. (1979). Briefly, to glass tubes were added, in order of appearance: 500 μ L of tissue supernatant; 50 μ L of SDS 8.1%; 1500 μ L of 20% acetic acid in aqueous solution (v/v) pH 3.5; 1500 μ L of 0.8 % thiobarbituric acid; and 700 μ L of distilled water. The mixture was vortexed and the reaction was carried out in a boiling water bath for 1 hour. The mixture was allowed to cool on water for 5 min, and was centrifuged 750 g for 10 min. The resulting pink stained TBA-RS were determined spectrophotometrically at 532 nm. A calibration curve was generated using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as a standard. TBA-RS were calculated as nmol TBA-RS/mg protein.

Hydroxyl radical scavenging capacity

To evaluate hydroxyl radical scavenger capacity a medium containing 100 μ L 3 mM 2-deoxy-D-ribose, 50 μ L 20 μ M FeSO₄, 50 μ L 100 μ M EDTA, 50 μ L 500 μ M hydrogen peroxide, 50 μ L 100 μ M ascorbic acid, 50 μ L sample and 150 μ L 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 with 140 mM KCl was incubated for 1 hour at 37°C in the dark

(Winterbourn, 1987; Gutteridge, 1991). 2-deoxy-D-ribose is oxidized by hydroxyl radicals formed by FeSO_4 and ascorbic acid releasing TBA-RS. After incubation, 150 μL 10% TCA and 500 μL 0,67% TBA was added and tubes were left for 1 hour at 100°C in a boiling water bath. The tubes were rapidly cooled and the absorbance was measured spectrophotometrically at 532 nm. A calibration curve was generated using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as a standard. Results were expressed by % inhibition of TBA-RS production.

2'7'-dichlorofluorescein oxidation assay

Reactive oxygen/nitrogen species production was measured following Lebel et al. (1992) method based on 2'7'-dichlorofluorescein (H_2DCF) oxidation. The 30 μL samples were incubated for 30 min at 37°C and dark with 30 μL 20 mM sodium phosphate and 140 mM KCl (pH 7,4) buffer and 240 μL 100 μM 2'7'-dichlorofluorescein diacetate ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) solution in a 96 wells plate. $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ is cleaved by cellular esterases and H_2DCF formed is eventually oxidized by ROS or RNS presenting in samples. The last reaction produces the fluorescent compound DCF which was measured at 488 nm excitation and 525 nm emission and the results were represented by nmol DCF/mg protein.

Protein determination

Protein concentration was determined in samples using bovine serum albumin as a standard (Lowry et al., 1951).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by one-way ANOVA, followed by the Tukey test for multiple comparisons using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer. A value of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

In vivo experiments

Fig. 1 shows the activity of antioxidant enzymes in the treatments, the pretreatment with lipoic acid prevented the diminution on CAT [$F(3,24) = 37.471$, $P < 0.05$], GSH-Px [$F(3,24) = 20.232$, $P < 0.05$] and G6PD [$F(3,24) = 37.556$, $P < 0.05$] activities caused by hyperphenylalaninemia. Besides, SOD [$F(3,28) = 29.102$, $P < 0.05$] activity were prevented by pretreatment. The non-enzymatic antioxidant system was evaluated by TRAP and GSH content (Fig. 2) and the pretreatment with LA recovered the TRAP [$F(3,24) = 33.044$, $P < 0.05$] and GSH [$F(3,24) = 25.088$, $P < 0.05$] levels significantly diminished by Phe accumulation.

To evaluate lipid damage, we measured TBA-RS production (Fig. 3). Lipoperoxidation were increased in hyperphenylalaninemia model [$F(3,24) = 32.771$, $P < 0.05$] and LA pretreatment inhibited TBA-RS production induced by Phe administration. The hydroxyl radical scavenger capacity of the samples is showed in Fig. 4 and it can be seen that hyperphenylalaninemia model decreased hydroxyl radical scavenger capacity [$F(3,24) =$

21.344 $P < 0.05$], but the pretreatment with lipoic acid did not recovered the capacity to scavenger hydroxyl radicals. Finally, we evaluated the reactive species generation by measuring DCF production (Fig. 5) which were increased in Phe group the [F(3,24) = 19.571 $P < 0.05$] and the lipoic acid pretreatment prevented this effect, showing that this antioxidant was able to efficiently detoxify reactive species produced.

In vitro experiments

The antioxidant enzyme activities measured from the *in vitro* experiments are shown in Fig. 6. It can be seen that the presence of 20 mM Phe in homogenates significantly decreased the activity of CAT [F(3,24) = 7.57, $P < 0.05$] and G6PD [F(3,28) = 16.7 $P < 0.05$], and these effects were recovered by pre-incubation of the homogenates with 0.1 mM lipoic acid. The Phe group showed significantly decrease of SOD activity [F(3,24) = 70.9 $P < 0.05$] and in groups previously exposed to lipoic acid the activity of this enzyme was increased. On the other hand, the activity of GSH-Px was not altered in the treatments studied [F(3,20) = 1.84 $P > 0.05$]. The non-enzymatic antioxidant system was evaluated by TRAP and GSH content (Fig. 7) and the pre-incubation with LA recovered TRAP [F(3,28) = 10.9 $P < 0.05$] but not GSH levels [F(3,20) = 17.3 $P < 0.05$] that were significantly decreased by Phe.

Next, we measured TBA-RS production (Fig. 8), and Phe increased lipoperoxidation [F(3,28) = 18.2 $P < 0.05$], but LA pre-incubation did not prevent the lipid damage induced by Phe toxicity. The hydroxyl radical scavenger capacity of the samples is shown in Fig. 9

and it can be seen that the excess of Phe in homogenates decreased the hydroxyl radical scavenger capacity [$F(3,23) = 240.382$ $P < 0.05$], but the pre-incubation with lipoic acid did not recover the capacity to scavenge hydroxyl radicals. Finally, we measured the reactive species generation (Fig. 10). Phe increased DCF production [$F(3,24) = 9.44$ $P < 0.05$] and lipoic acid pre-incubation was efficient to maintain this measure at the same level of the controls.

Discussion

Recently the involvement of oxidative stress in neuronal dysfunction caused by phenylketonuria has been proposed in many studies (Colomé et al., 2000; Wajner et al., 2004). The role of Phe accumulation in free radicals production and reducing the antioxidant status has been described in experimental models and patients with PKU (Sierra et al., 1998; Hagen et al., 2002; Artuch et al., 2004; Sirtori et al., 2005; Sitta et al., 2006; Colomé et al., 2007; Sitta et al., 2009). In addition, it is possible that the current treatment required for the disease, a Phe-restricted diet, alter the antioxidant status of the patients (Van Bakel et al., 2000; Schulpis et al., 2005). Consequently, studies with antioxidant treatment in hyperphenylalaninemia have been increasing (Martinez-Cruz et al., 2002).

In the present study, we evaluated the effect of a pretreatment with lipoic acid in rats subject to an acute hyperphenylalaninemia-induced model which is known to alter several parameters of oxidative stress. Initially, we study the activity of the antioxidant enzymes. Catalase is an enzyme that converts hydrogen peroxide into a water and oxygen molecule.

This enzyme was inhibited in hyperphenylalaninemic rats what can lead to hydrogen peroxide accumulation. Phe can inhibit CAT activity *in vitro* and *in vivo* (Hagen et al., 2002), and LA can prevent this inhibition effect. In addition, LA is capable to scavenger hydrogen peroxide (Packer et al., 1995). A similar preventive effect of LA was obtained considering the inhibition of SOD activity in hyperphenylalaninemic rats. Again, LA has scavenging capacity against superoxide radicals (Packer et al., 1995). Our results also showed that hyperphenylalaninemia inhibits GSH-Px activity, which degrades hydrogen peroxide and other peroxides utilizing GSH and selenium (Se) as cofactors, and LA prevents this inhibition. It is known that Phe inhibits GSH-Px *in vitro* and *in vivo* (Hagen et al., 2002). In addition to this effect, LA has the ability to increase GSH (Packer et al., 1995, Packer et al., 1997), which is an essential cofactor of GSH-Px, helping to increase the activity of the enzyme. Dihydrolipoic acid, a LA derivative, also serves as an electron donor to glutathione peroxidase since it is a dithiol compound (Cao and Phillis, 1995). Considering that PKU patients under treatment may present Se deficiency (Wilke et al., 1992, Sierra et al., 1998), the action of LA by all these mechanisms restoring GSH-Px activity may be very important. The last antioxidant enzyme evaluated in this work was G6PD, which activity decreased in Phe group. G6PD is an enzyme of pentose phosphate pathway that generates NADPH as a final product (Leong and Clark, 1984), an important compound to be used to recycling GSH from oxidized glutathione (GSSG) by the enzyme glutathione reductase (GR). So, the preservation of G6PD activity by LA is also another important factor to maintain enzymatic and non-enzymatic GSH antioxidant system working well.

The total reactive antioxidant potential and the glutathione content of the samples were decreased in brain hyperphenylalaninemic rats. This effect was prevented in the group that received LA pretreatment and GSH content was increased in the group that received LA alone. The diminution in TRAP and GSH content caused by Phe accumulation in animals suggests that an increase in free radicals may be present that compromises the antioxidant capacity of the samples. Hagen et al. (2002) have observed the same effect in *in vivo* and *in vitro* experiments. The increase of TRAP (which represents an inespecific non-enzymatic antioxidant parameter) in groups that received LA may be due to its ability to interact and improve the action of other antioxidants such as vitamin E, vitamin C, thioredoxin, ubiquinol and glutathione recycling system along with the fact that dihydrolipoic acid exhibits thiol reductase activity (Packer et al., 1995, Packer et al., 1997). GSH content was reduced in hyperphenylalaninemic group and was restored in rats that received LA pretreatment. Interestingly, it is known that LA induces the expression and activity of γ -glutamyl-cysteine ligase (γ -GCL) that is a rate-limiting enzyme in the GSH synthesis (Bharath et al., 2002, Suh et al., 2003), and that DHLA has the ability to recycle GSH as mentioned above.

To evaluate oxidative damage to lipids, TBA-RS was determined and data showed that Phe significantly increases this parameter. Increased malondialdehyde formation, a product of lipid peroxidation, has been detected in plasma of patients with PKU (Sirtori, et al., 2005, Sitta et al., in press). Many studies have shown that both LA and DHLA scavenge reactive species (Scott et al., 1994, Packer et al., 1995), so it is plausible that these compounds can inhibit lipoperoxidation that is triggered by many reactive species. On the other hand, the

decrease of antioxidant status caused by Phe could be responsible for the reduction in scavenger capacity of many free radicals, especially hydroxyl radicals, in hyperphenylalaninemia group.

Besides, we observed that the decreased capacity to scavenge hydroxyl radicals caused by hyperphenylalaninemia was not prevented by pretreatment with LA. According to Teichert and Preiss (1992), from 21% to 45% of the lipoic acid administered is converted to dihydrolipoic acid and this compound do not scavenge hydroxyl radicals generated by hydrogen peroxide, Fe ion and ascorbate system probably because DHLA increased the effectiveness of this system maintaining the sources of ascorbate as a reductant (Scott et al., 1994, Packer et al., 1995). We cannot affirm that the results observed in Phe+LA group related to hydroxyl radical scavenger capacity is due to this fact, but it is a plausible possibility to explain that.

The last parameter analyzed was DCF formation which represents an index of unespecific reactive species production. Hyperphenylalaninemia model increased the concentration of these compounds confirming that Phe leads to a reactive species overproduction. Rats that received LA maintained the production of reactive species at similar to that of controls, and this effect observed in our study must be due to LA and DHLA capacity to quenching specific free radicals and other reactive species as hydrogen peroxide and oxygen singlet (Packer et al., 1995, Packer et al., 1997).

We also analyzed if lipoic acid was capable to prevent the alterations caused by Phe on the same parameters of oxidative stress *in vitro*. In fact, this was the case considering the activity of antioxidant enzymes, TRAP, and DCF. These effects were also observed in previous *in vivo* experiments. So, we can suppose that the mechanisms responsible by LA effect occur even in a disrupted tissue preparation, like as homogenates, strengthening the hypothesis for a LA direct scavenging action. On the other hand, LA was not capable to prevent Phe alterations on GSH content, TBA-RS, and hydroxyl radical scavenging capacity.

Oxidative stress is a disequilibrium between the amount of oxidants and antioxidants in favor to oxidants (Halliwell and Gutteridge, 2007), what can potentially lead to damage. In normal conditions, there is a balance between reactive species generation and their removal by antioxidants that is the redox homeostasis whose main mechanism is the redox signaling that leads to an expression of antioxidant enzymes and the increase in intracellular glutathione (Dröge, 2002). According to Halliwell and Gutteridge (2007), antioxidants are substances that, in low concentrations, are able to compete with oxidizable substrates inhibiting their oxidation. Lipoic acid and its reduced form, DHLA, are considered as ideal antioxidants for their capacity of chelating metals, quenching specific radicals, interact with other antioxidants and induce gene expression (Packer et al., 1995). Due to the low concentration of LA in organism, its exogenous supplementation for treatment in conditions of oxidative stress has been successful in many cases (Packer et al., 1995, Packer et al., 1997, Hermes-Lima, 2004).

The hyperphenylalaninemia model used in this study induces oxidative stress in the brain of Wistar rats probably indicating that there is an involvement of oxidative damage in pathophysiology of the disease. Considering the data reported in this work, an antioxidant treatment may be important to avoid the oxidative stress promoted by hyperphenylalaninemia since the pretreatment with lipoic acid have shown to be efficient in improving activity of antioxidant enzymes, increasing non-enzymatic antioxidant defenses and reduction in lipid damage and reactive species production. Considering that the usually treatment required in phenylketonuria is a Phe-restricted diet that is low in antioxidants (Van Bakel et al., 2000; Schulpis et al., 2005), probably a diet supplemented with antioxidants should be an additional therapy suitable to these patients, since it can improve the redox homeostasis. More studies must be done to understand how Phe induce oxidative stress and LA prevents it and if these results were observed in patients a supplemented diet with antioxidants, especially LA, could be important in PKU treatment.

References

Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. Meth Enzymol 105: 121-126.

Arivazhagan, P., Panneerselvam, C., 2000. Effect of dl- α -lipoic acid on neural antioxidants in aged rats. Pharmacol. Res. 42, 219–222.

Artuch R., Colomé C., Sierra C., Brandi N., Lambruschini J.C., Urgate D. and Vilaseca M.A. (2004) A longitudinal study of antioxidant status in phenylketonuric patients. *Clin. Biochem.* 37, 198-203.

Blass J.P. Inborn errors of pyruvate metabolism. In: Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein J.L., Brown M.S. (Ed.) *The metabolic basis of inherited disease*. New York: Mc Graw Hill, 1983, 193-203.

Bharath S, Cochran BC, Hsu M, Liu J, Ames BN, Andersen JK (2002) Pre-treatment with R-lipoic acid alleviates the effects of GSH depletion in PC12 cells: implications for Parkinson's disease therapy. *Neurotoxicology*, 23, 479–486.

Browne RW, Armstrong D (1998) Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Meth Enzymol* 108: 347-352.

Burgard, P. (2000) Development of intelligence in early treated phenylketonuria, *Eur. J. Pediatr.* 159, 74–79.

Cao, X., Phillis, J.W., 1995. The free radical scavenger, alpha-lipoic acid, protects against cerebral ischemia-reperfusion injury in gerbils. *Free Radic. Res.* 23(4), 365 – 70.

Clark J.B., Bates T.E., Cullingford T., Land J. M. (1993) Development of enzymes of energy metabolism in neonatal mammalian brain. *Dev Neurosci*, 15, 174-180.

Colomé C., Artuch R., Vilaseca M.A., Sierra C., Brandi N., Lambruschini N., Cambra F.J. and Campistol J. (2003) Lipophilic antioxidants in patients with phenylketonuria. *Am. J. Clin. Nutr.* 13, 2561-2564

Curtis, H. C. Wiederswieser, G. Viscontini, N. Leimbacher, H. Wegman, H. Schidt, Serotonin and dopamin synthesis in phenylketonuria, *Adv. Exp. Med. Biol.* 133 (1981) 277– 291.

Dröge, W. (2002) Free radicals in physiology control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47-95.

Evelson P., Travacio M., Repetto M., Escobar J., Llesuy S. and Lissi E.A. (2001) Evaluation of total reactive antioxidant potencial (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch. Biochem. Biophys.* 388, 261-266.

Fuchs, J., Schofer, H., Milbradt, R., Freisleben, H.J., Buhl, R., Siems, W., Grune, T., 1993. Studies on lipoate effects on blood redox state in human immunodeficiency virus infected patients. *Arzneimit. Forsch.* 43, 1359–1362.

Gutteridge, J.M.C. (1991). Hydroxyl radical formation from the auto-reduction of a ferric citrate complex. *Free Rad Biol Med* 11:401-406.

Hagen, T.M., Ingersoll, R.T., Lykkesfeldt, J., Liu, J., Wehr, C.M., Vinarsky, V., Bartholomew, J.C., Ames, B.N., 1999. (R)- α -lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *Faseb J.* 13, 411-418.

Hagen M.E.K., Pederzoli C.D., Sgaravatti A.M., Bridi R., Wajner M., Wannmacher C.M., Wyse A.T. and Dutra-Filho C.S. (2002) Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. *Biochem. Biophys. Acta.* 1586, 344-352.

Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4^o edição. New York: Oxford University Press.

Hermes-Lima M. (2004) Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals. In: *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Storey K.S. (Ed.). John Wiley & Sons, Inc., 12, 319-368.

Hommes F.A., Polman H.A., Patrick A.D. (1968) Leigh's encephalomyelopathy: An inborn error of gluconeogenesis. *Arch. Dis. Childhood*, 43, 423-426.

Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5: 227-231.

Leong SF Clark JB (1984) Regional enzyme development in rat brain. Enzymes associated with glucose utilization. *Biochem J* 218: 131-138.

Lissi E, Pascual C, Del Castillo MD (1992) Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radic Res Commun* 17: 299-311.

Lodge, L., Handelman, G. J., Konishi, T., Matsugo, S., Mathur, V. V., and Packer, L. (1997). Natural sources of lipoic acid: Determination of lipoyllysine released from protease-digested tissues by high performance liquid chromatography incorporating electrochemical detection. *J. Appl. Nutr.* 49, 3–11.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Malaton R., Stumpf D.A., Michals K., hart R.D., Parks J.K., Goodman S.I. (1984) Lipoamide dehydrogenase deficiency with primary lactic acidosis: Favorable response to treatment with oral lipoic acid. *J. Pediatr.*, 104, 65-69.

Marklund SL (1985). Pyrogallol autoxidation. In: Greenwald RA (ed) *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, pp 243-247.

Martinez-Cruz F., Pozo D., Osuna C., Espinar A., Marchante C. and Guerrero J.M. (2002) Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: prevention by melatonin, vitamin E and Vitamin C. *J. Neurosci. Res.* 69, 550-558.

Moini, H., Tirosh, O., Park, Y. C., Cho, K. J. & Packer, L. (2002) R- α -lipoic acid action on cell redox status, the insulin receptor, and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 384-391

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.

Packer, L., Wiltf, E.H., Tritschler, H.J., 1995. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine* 19 (2), 227-250.

Packer, L., Tritschler, H.J., Wessel K., 1997. Neuroprotection by the metabolic antioxidant α -lipoic acid. *Free Radical Biology and Medicine* 22, 359-378.

Roy, S., Sen, C.K., Tritschler, H.J., Packer, L., 1997. Modulation of cellular reducing equivalent homeostasis by α -lipoic acid. Mechanisms and implications for diabetes and ischemic injury. *Biochem. Pharmacol.* 53, 393-399.

Samuel, S., Kathirvel, R., Jayavelu, T., Chinnakkannu, P., 2005. Protein oxidative damage in arsenic induced rat brain: influence of DL- α -lipoic acid. *Toxicology Letters* 155, 27-34.

Schulpis K.H., Tsakiris S., Traeger-Synodinos J. and Papassotiriou I. (2005) Low total antioxidant status is implicated with high 8-hydroxy-2-deoxyguanosine serum concentrations in phenylketonuria. *Clin. Biochem.* 38, 239-242.

Scott B.C., Aruoma O.I., Evans P.J. O'Neill C., van der Vliet A., Cross C.E., Trtschler H., Halliwell B. (1994) Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants: A critical evaluation. *Free Rad. Res.*, 20, 119-133.

Scriver C.R. and Kaufman S. (2001) Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. In Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Walle D. (editores). *The Metabolic & Molecular Inherited Disease*. 8^a ed. Volume II. New York: McGraw-Hill. Cap. 77, 1667-1724.

Sierra C., Vilaseca M.A., Moyano D., Brandi N., Campistol J., Lambruschini N., Cambra Fco. J., Deulofeu R. and Mira A. (1998) Antioxidant status in hyperphenylalaninemia. *Clin. Chim. Acta.* 276, 1-9.

Sirtori L.R., Dutra-Filho C.S., Fitarelli D., Sitta A., Haeser A., Barschak A.G., Wajner M., Coelho D.M., Llesuy S., Belló-Klein A., Giugliani R., Deon M. and Vargas C.R. (2005) Oxidative stress in patients with phenylketonuria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1740, 68-73.

Sitta A., Barschak A.G., Deon M., Terroso T., Pires R., Giugliani R., Dutra-Filho C.S., Wajner M. and Vargas C.R. (2006) Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. *Metab. Brain Dis.* 4, 287-296.

Sitta A., Barschak A.G., Deon M., Barden A.T., Biancini G.B., Vargas P.R., de Souza C.F., Netto C., Wajner M., Vargas C.R. (1999) Effect of short and long-term exposition to high phenylalanine blood levels on oxidative damage in phenylketonuric patients. *Int J. Devel Neuroscience*, in press.

Start, K., 1998. Treating phenylketonuria by an phenylalanine-free diet. *Prof. Care Mother Child* 8, 109–110.

Suh, J.H., Shenvi, S.V., Dixon, B.M., Liu, H., Jaiswal, A.K., Liu, R., Hagen, T.M., 2004. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *PNAS* 101 (10), 3381-3386.

Sumathi, R., Baskaran, G., Varalakshmi, P., 1996. Effect of DL α -lipoic acid on tissue redox state in acute cadmium-challenged tissues. *Nutritional Biochemistry* 7, 85-92.

van Backel M.M., Printzen G., Wermuth B. and Wiesmann U.N. (2000) Antioxidant and thyroid hormone status in selenium-deficient phenylketonuric and hyperphenylalaninemic patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 976-981.

Wajner M., Latini A., Wyse A.T. and Dutra-Filho C.S. (2004) The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J. Inherit. Metabol. Dis.* 27, 427-448.

Wilke B.C., Vidailhet M., Favier A., Guillemin C., Ducros V., Arnaud J. and Richard M.J. (1992) Selenium, glutathione peroxidase (GSH-Px) and lipid peroxidation products before and after selenium supplementation. *Clin. Chim. Acta.* 207, 137-142.

Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Meth Enzymol* 77: 325-332.

Winterbourn, C.C. (1987). The ability of scavengers to distinguish OH^\bullet production in the iron-catalyzed Haber-Weiss reaction: a comparison of four assays for OH^\bullet . *Free Rad Biol Med* 3:33-39

Ziegler, D., Reljanovic, M., Mehnert, H., Gries, F.A., 1999. α -Lipoic acid in the treatment of diabetes polyneuropathy in Germany: current evidence from clinical trials. *Exp. Clin. Endocrin. Diab.* 107, 421-430.

Figure Captions

Fig. 1 Effect of acute hyperphenylalaninemia-induced model with and without LA pretreatment on antioxidant enzymes activities in cerebral from young rats: catalase (A), superóxide dismutase (B), glutathione peroxidase (C) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (D). Results are mean \pm SD (n=7-8), * p<0.05 compared to control (Tukey test).

Fig. 2 Effect of acute hyperphenylalaninemia-induced model with and without LA pretreatment on antioxidant content non-enzymatic in cerebral from young rats: total reactive antioxidant potencial (A) and total content of intracellular glutathione (B). Results are mean \pm SD (n=7), * p<0.05 compared to control (Tukey test).

Fig. 3 Effect of acute hyperphenylalaninemia-induced model with and without LA pretreatment on production of tiobarbituric acid reactive species (TBA-RS) in cerebral from young rats. Results are mean \pm SD (n=7), * p<0.05 compared to control (Tukey test).

Fig. 4 Effect of acute hyperphenylalaninemia-induced model with and without LA pretreatment on hydroxyl radical scavenger capacity in cerebral from young rats. Results are expressed in percentage of the control (n=7), * p<0.05 compared to control (Tukey test).

Fig. 5 Effect of acute hyperphenylalaninemia-induced model with and without LA pretreatment on reactive species production in cerebral from young rats. Results are mean \pm SD (n=7), * p<0.05 compared to control (Tukey test).

Fig. 6 Effect *in vitro* of Phe toxicity with and without the LA pretreatment on antioxidant enzymes activities in cerebral from young rats: A, catalase (n=7); B, superóxide dismutase (n=7); C, glutathione peroxidase (n=6) and D, glucose-6-phosphate dehydrogenase (n=8). Results are mean \pm SD, * $p < 0.05$ compared to control (Tukey test).

Fig. 7 Effect *in vitro* of Phe toxicity with and without the LA pretreatment on antioxidant content non-enzymatic in cerebral from young rats: A, total reactive antioxidant potencial (n=8) and B, total content of intracellular glutathione (n=6). Results are mean \pm SD, * $p < 0.05$ compared to control (Tukey test).

Fig. 8 Effect of *in vitro* of Phe with and without the LA pretreatment on production of tiobarbituric acid reactive species in cerebral from young rats. Results are mean \pm SD (n=8), * $p < 0.05$ compared to control (Tukey test).

Fig. 9 Effect of *in vitro* of Phe with and without the LA pretreatment on hydroxyl radical scavenger capacity in cerebral from young rats. Results are expressed in percentage of the control (n=7, except to Phe group, n=6), * $p < 0.05$ compared to control (Tukey test).

Fig. 10 Effect of *in vitro* of Phe with and without the LA pretreatment on reactive species production in cerebral from young rats. Results are mean \pm SD (n=7), * $p < 0.05$ compared to control (Tukey test).

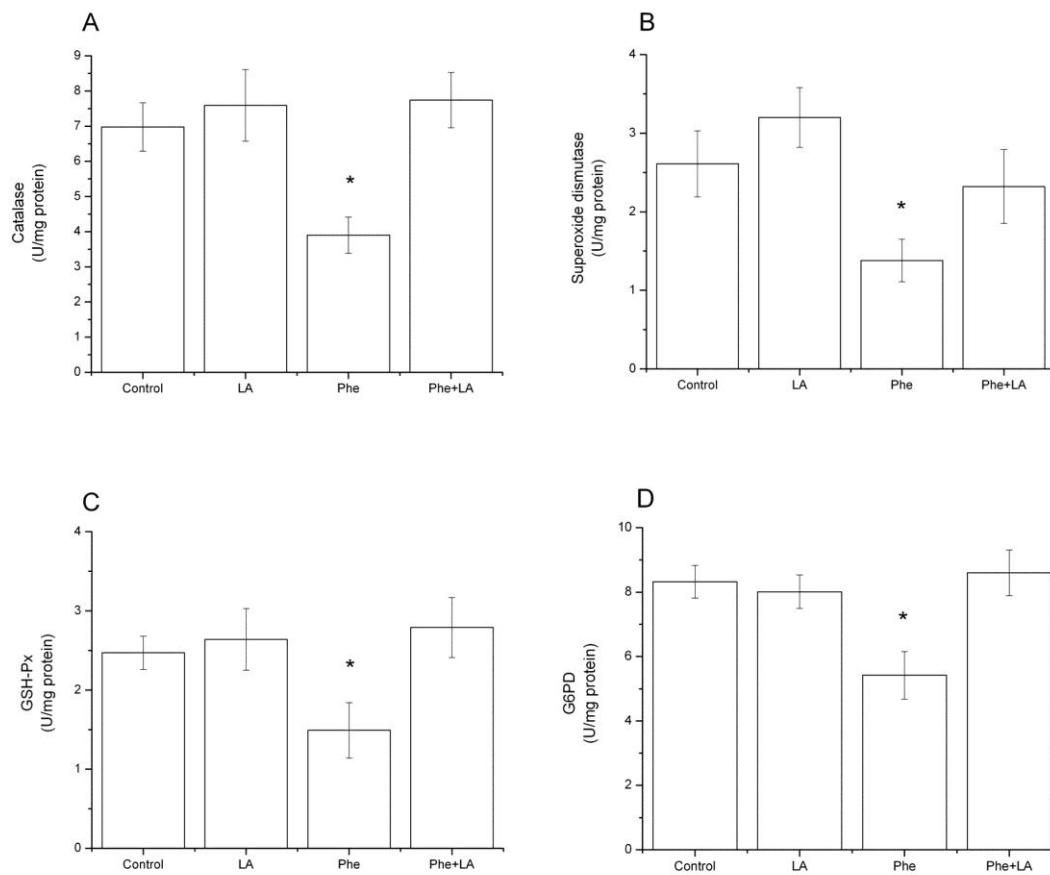
Figure 1

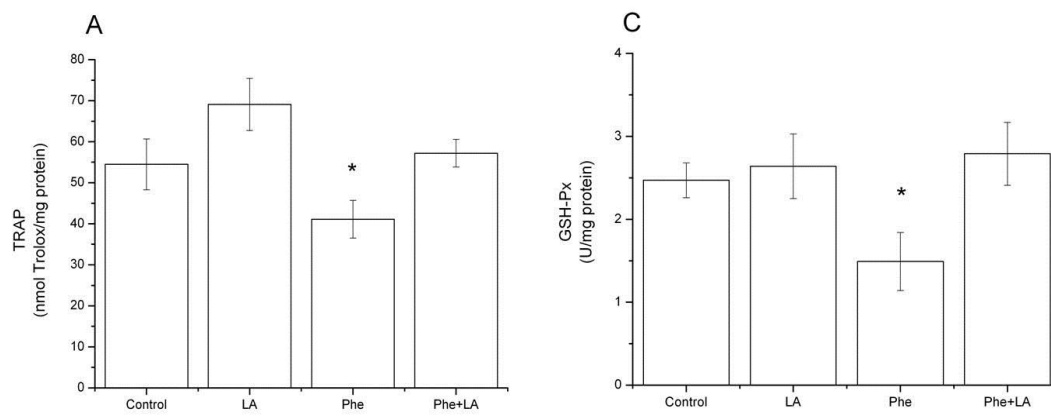
Figure 2

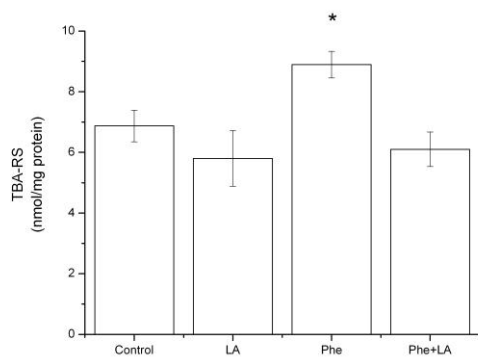
Figure 3

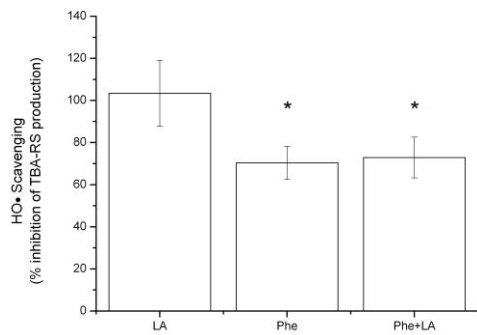
Figure 4

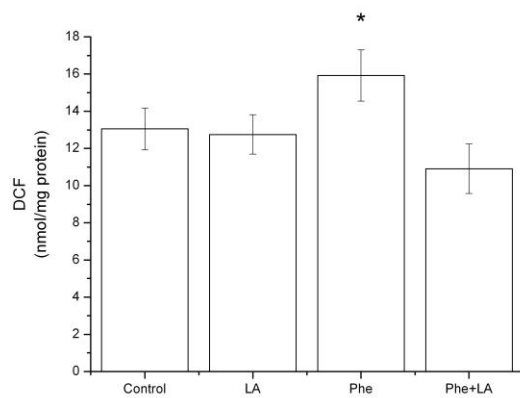
Figure 5

Figure 6

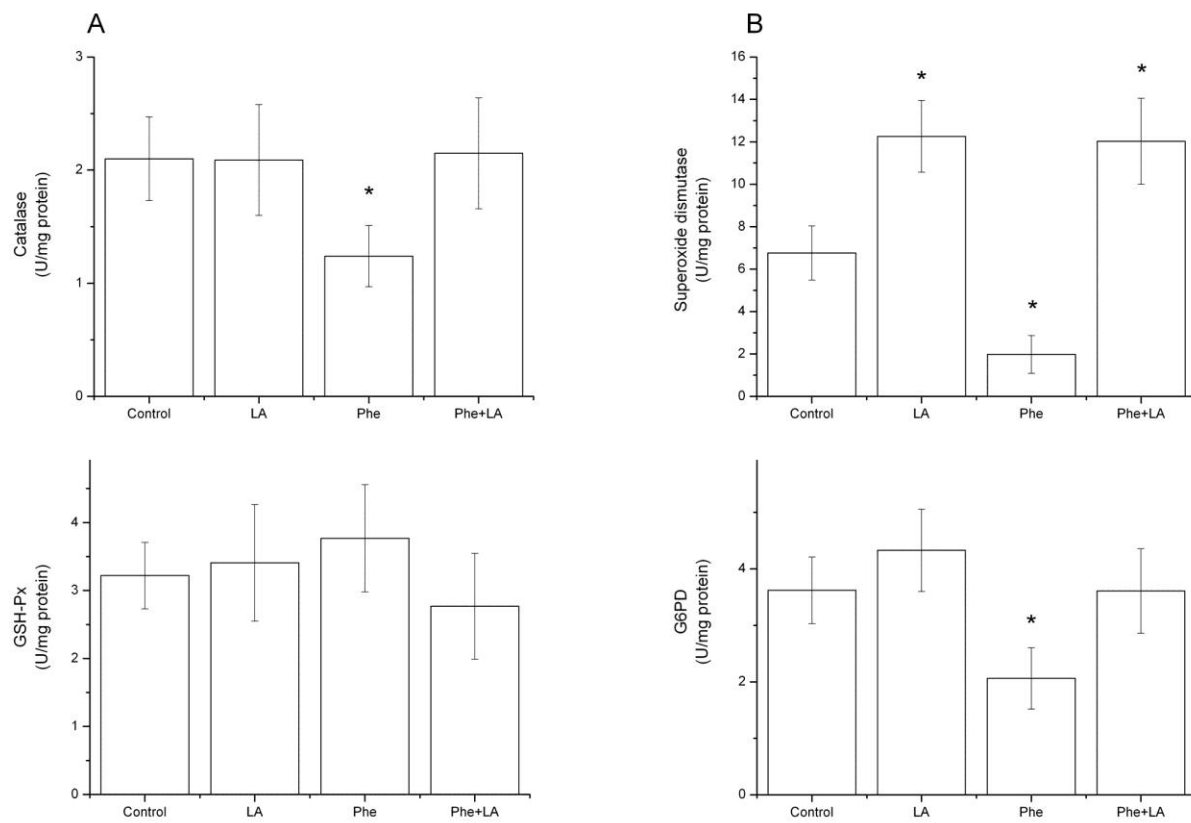


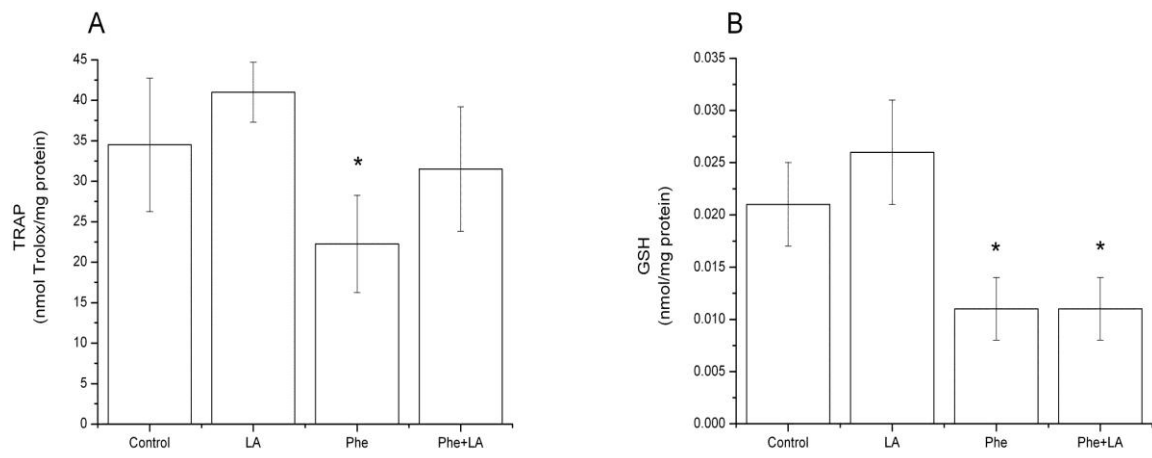
Figure 7

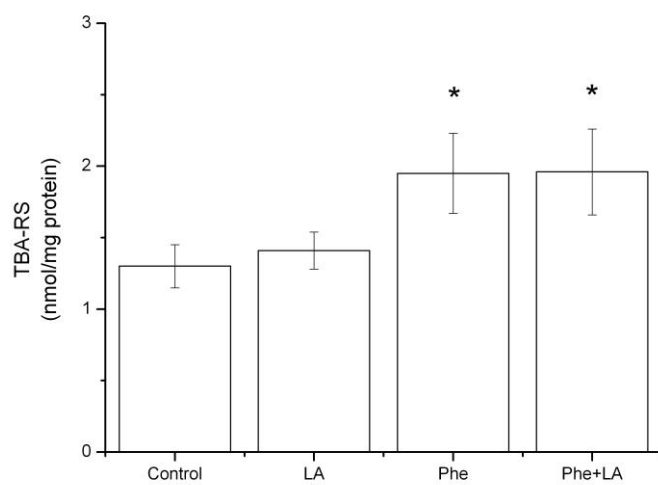
Figure 8

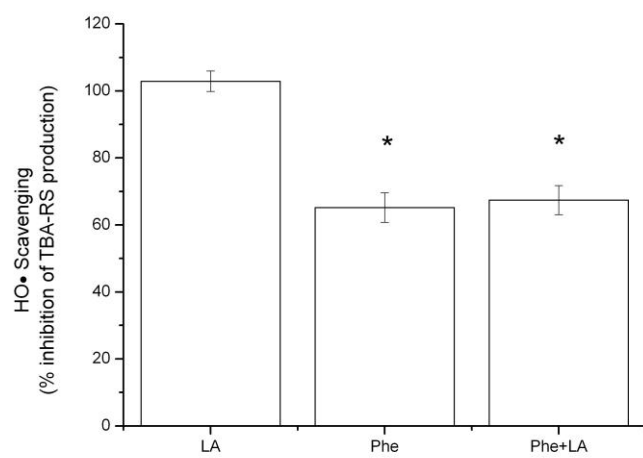
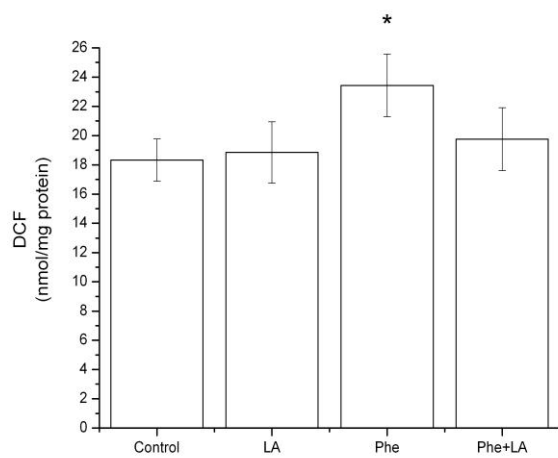
Figure 9

Figure 10

Capítulo III – Resultados não incluídos em artigos.

Materiais e Métodos

Animais e Reagentes

Para a realização dos experimentos foram utilizados aproximadamente 50 ratos Wistar de sete dias de vida, nascidos e criados no Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. As matrizes tinham livre acesso à água e à ração comercial padrão (Germani, Porto Alegre, RS, Brasil), contendo 20,5 % de proteínas (predominantemente de semente de soja), 54 % de carboidratos, 4,5 % de fibras, 4 % de lipídios, 7 % de cinzas e 10 % de umidade. A temperatura da sala onde os ratos permaneciam até o dia de seu sacrifício era mantida em $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, com um ciclo de claro-escuro de 12-12 horas. Os “Princípios de Cuidados aos Animais de Laboratório” (publicação do NIH nº 85-23, revisado em 1985) foram seguidos em todos os experimentos. Todos os reagentes foram obtidos de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

Modelo agudo de hiperfenilalaninemia

Ratos Wistar de 11 a 13 dias de vida foram utilizados durante os três dias de injeções subcutâneas para a realização do modelo agudo de hiperfenilalaninemia, de acordo com Hagen e colaboradores (2002) com modificações. Os animais foram divididos em 4 grupos onde o grupo controle recebeu solução salina e o grupo AL recebeu uma dose de 100 mg/kg nos três dias. Já os animais do modelo de hiperfenilalaninemia (grupo Phe) receberam, no primeiro dia, solução salina e o grupo Phe+AL recebeu a mesma dose do grupo AL. No segundo dia, o grupo Phe recebeu uma dose de 1,6 $\mu\text{mol/g}$ de α -Metil-

fenilalanina (inibidor da PAH) e o grupo Phe+AL recebeu além da dose de ácido lipóico 1,6 $\mu\text{mol/g}$ de α -Metilphenilalanina. No último dia, o grupo Phe recebeu 2,1 $\mu\text{mol/g}$ de L-fenilalanina e o grupo Phe+AL recebeu 100 mg/kg de ácido lipóico + 2,1 $\mu\text{mol/g}$ de L-fenilalanina, e após 1 hora da última injeção os animais foram sacrificados.

Preparação do tecido

Nos dias dos experimentos, os ratos foram sacrificados por decapitação, sem anestesia, sendo seus cérebros imediatamente removidos, descartando-se o cerebelo, bulbos olfatórios, ponte e medula. Os cérebros foram então pesados e mantidos no gelo até serem homogeneizados em tampão de homogeneização (tampão fosfato de sódio 20 mM com KCL 140 mM, pH 7,4) numa relação de 1:5 de peso e volume. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 1000g por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante usado para a medida dos parâmetros de dano protéico.

Curvas de concentração

Para determinar as concentrações de AL e de Phe a serem utilizadas no experimento in vitro foram realizadas curvas de concentrações de 0,01, 0,1, 0,25, 0,5 e 1,0 mM de ácido lipóico e 1, 5, 10 e 20 mM de fenilalanina. As curvas foram realizadas separadamente e com a incubação no homogeneizado por 1 hora a 37°C e a técnica utilizada como parâmetro de dano foi TBA-RS descrito em seguida.

Experimentos in vitro

As amostras foram divididas em quatro grupos: controle, AL, Phe e Phe + AL. O experimento constou de uma pré-incubação e de uma incubação de 1 hora cada, a 37 ° C.

Na pré-incubação, 0,1 mM de ácido lipóico foi adicionado aos grupos AL e Phe + AL enquanto nos grupos controle e Phe foram adicionados água destilada. Após 1 hora, 20 mM L-fenilalanina foi adicionado no grupo Phe e Phe + AL enquanto a água destilada foi adicionada no controle e no grupo AL.

Medida do conteúdo de grupos carbonila

Esta medida foi realizada de acordo com o método de Reznick e Packer (1994). As proteínas modificadas oxidativamente expõem grupos carbonila nos resíduos de seus aminoácidos, sendo este então um marcador de modificação oxidativa em proteínas. O método baseia-se na reação dos grupos carbonilas com dinitrofenil hidrazina (DNPH) em banho-maria de 60° C, formando uma dinitrofenil hidrazona correspondente, lida em espectrofotômetro a 370 nm. Os resultados foram expressos em conteúdo de carbonila/mg de proteína.

Medida de tióis totais

Este parâmetro foi realizado de acordo com o método de Aksenov e Markesbery (2001). A oxidação dos tióis livres da amostra leva à formação de pontes dissulfeto; o ácido ditionitrobenzóico (DTNB), reagente de cor, é reduzido pelos tióis não oxidados, gerando um derivado amarelo (TNB), lido espectrofotometricamente a 412 nm. Com isso o método determina os tióis totais da amostra. Os resultados foram expressos em nmol de TNB/mg de proteína.

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

A medida das TBA-RS foi realizada de acordo com o método de Esterbauer e Cheeseman (1990). Após a incubação do homogeneizado, 150 μ L deste foram adicionados a 300 μ L de ácido tricloroacético 10 % (TCA) e centrifugado a 300g por 10 min. Trezentos μ L do sobrenadante foram transferidos para um tubo Pyrex e incubados com 300 μ L de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.67 % em sulfato de sódio 7,1 %, em banho fervente por 25 min. A mistura foi esfriada em água gelada por 5 min. Durante o aquecimento é formado um composto rosa, que foi medido espectrofotometricamente a 532 nm. Esta coloração é proporcional à quantidade de malondialdeído formado. Uma curva de calibração foi feita, utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão. TBA-RS foi calculado como nmol TBA-RS/mg proteína.

Determinação de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada no homogeneizado, pelo método de Lowry e colaboradores (1951) utilizando albumina bovina como padrão.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada pela análise de variância de uma-via (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para múltipla comparação quando o valor de F foi significativo. Todas as análises foram realizadas através do software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todos os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP).

Resultados

A figura 1 mostra que as concentrações de Phe que aumentaram significativamente a produção de TBA-RS no homogeneizado foram as de 10 e 20 mM de fenilalanina [$F(4,25) = 6,523$, $P < 0,05$]. A figura 2 mostra que as concentrações de ácido lipóico que não alteraram as TBA-RS em relação ao controle foram as de 0,01 e 0,1 mM [$F(5,18) = 24,052$, $P < 0,05$].

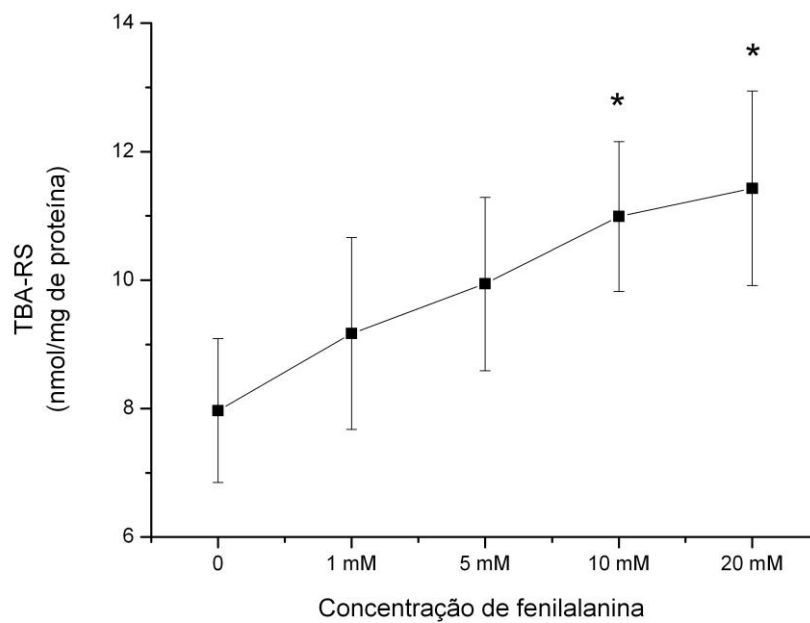


Figura 1. Efeito *in vitro* da fenilalanina em diversas concentrações sobre o conteúdo de TBA-RS em cérebro de ratos jovens. Resultados expressos em média \pm desvio padrão, $n=6$. * $P < 0,05$ em relação ao controle (Teste de Tukey).

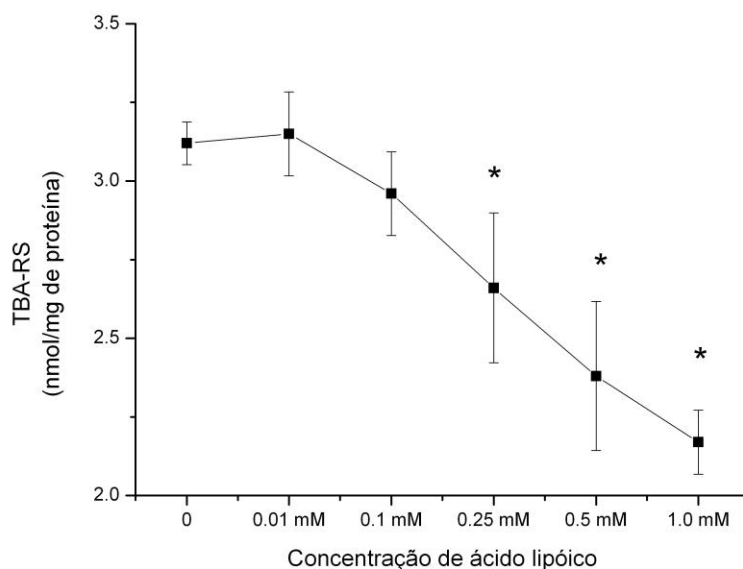


Figura 2. Efeito do ácido lipóico em diversas concentrações sobre o conteúdo de TBA-RS em cérebro de ratos jovens. Resultados expressos em média \pm desvio padrão, $n=4$. * $P<0,05$ em relação ao controle (Teste de Tukey).

Os parâmetros de dano protéico estão representados nas figuras 3 e 4. Os resultados não mostram alteração no conteúdo de carbonilas nos experimentos *in vivo* [$F(3,24) = 2,301$, $P > 0,05$] e *in vitro* [$F(3,20) = 1,805$, $P > 0,05$]. O conteúdo de tióis totais das amostras também não foi alterado no modelo agudo da hiperfenilalaninemia [$F(3,20) = 2,577$, $P > 0,05$] e pela adição de Phe *in vitro* [$F(3,24) = 2,458$, $P > 0,05$].

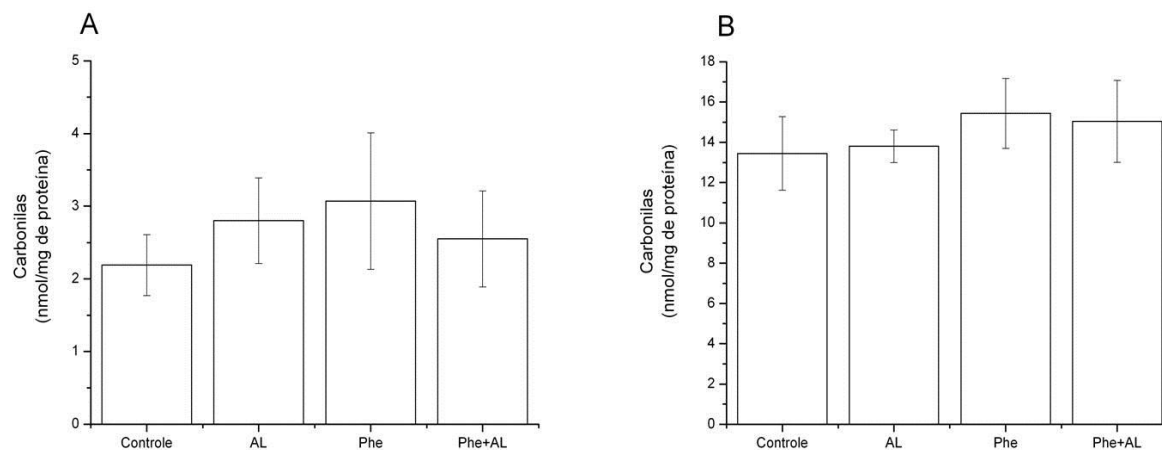


Figura 3. Conteúdo de carbonilas formado. A, efeito *in vitro* (n=6) do AL (0,1 mM) e da Phe (20 mM). B, efeito *in vivo* (n=7) dos tratamentos com AL (100 mg/Kg) e Phe (1,6 μ mol/g de α -MePhe + 2,1 μ mol/g de Phe). Resultados expressos em média \pm desvio padrão, n=4. Não houve diferença estatística entre os grupos (ANOVA).

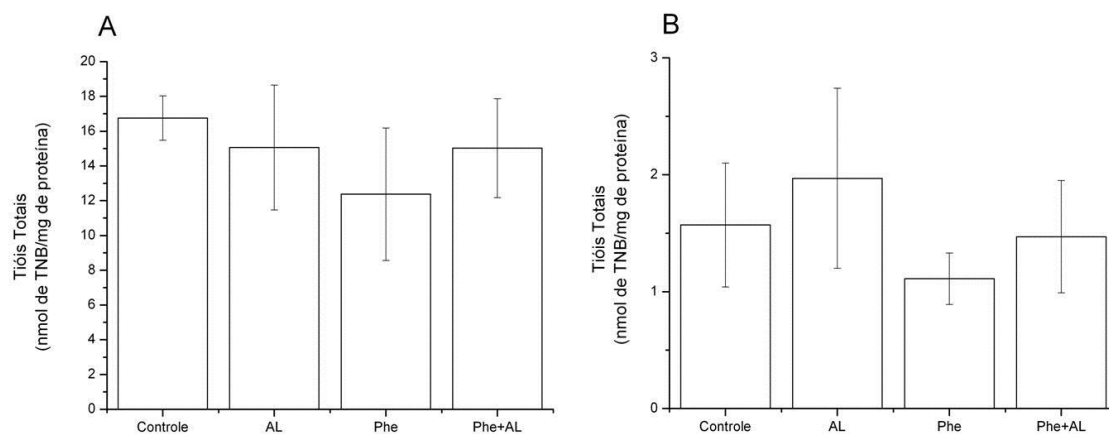


Figura 4. Conteúdo de tióis totais. A, efeito *in vitro* (n=7) do AL (0,1 mM) e da Phe (20 mM). B, efeito *in vivo* (n=6) dos tratamentos com AL (100 mg/Kg) e Phe (1,6 μ mol/g de α -MePhe + 2,1 μ mol/g de Phe). Resultados expressos em média \pm desvio padrão, n=4. Não houve diferença estatística entre os grupos (ANOVA).

Parte III

Discussão

Muitos trabalhos vêm descrevendo o envolvimento do estresse oxidativo em erros inatos do metabolismo (Colomé et al., 2000; Wajner et al, 2004). O papel da toxicidade causada pela Phe na produção de radicais livres e/ou na redução de antioxidantes tem sido investigado em pesquisas com modelos experimentais e pacientes (Serra et al., 1998; Hagen et al., 2002; Artuch et al., 2004; Sirtori et al. 2005; Sitta et al., 2006; Colomé et al., 2007; Sitta et al., 2009). Além do efeito direto da Phe no dano oxidativo, é possível que o próprio tratamento aplicado para a doença, uma dieta restrita em proteínas, altere o status antioxidante dos pacientes (Van Bakel et al., 2000; Schulpis et al., 2005). Sendo assim, tem sido proposto o tratamento com antioxidantes para a hiperfenilalaninemia (Martinez-Cruz et al., 2002).

Neste trabalho procuramos avaliar o papel do ácido lipóico como antioxidante frente à toxicidade da fenilalanina em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* em termos de estresse oxidativo gerado. Para isso, em primeiro lugar foi proposto um pré-tratamento com ácido lipóico em um modelo agudo de hiperfenilalaninemia e posteriormente, a fim de tentar avaliar o mecanismo de ação envolvido, foi realizado um estudo *in vitro* com uma concentração de Phe acima do encontrado e plasma de pacientes fenilcetonúricos para evidenciar seus efeitos tóxicos.

Inicialmente, as enzimas a atividade das enzimas antioxidantes foram analisadas e os resultados mostraram que a Phe inibiu a atividade da CAT, SOD, GSH-Px e G6PD. A catalase é uma enzima que converte peróxido de hidrogênio em uma molécula de oxigênio e água. Esta enzima foi inibida em ratos fenilcetonúricos o que pode levar ao acúmulo de peróxido de hidrogênio. Phe inibe a atividade da CAT tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Hagen et al., 2002), e o AL pôde prevenir esse efeito inibitório. Além disso, o AL é capaz de

eliminar diretamente peróxido de hidrogênio (Packer et al., 1995). O mesmo efeito protetor do AL observado considerando a inibição da atividade da SOD em ratos com hiperfenilalaninemia. Novamente, o AL também é capaz de eliminar diretamente radicais superóxido (Packer et al., 1995). Nossos resultados também mostraram que o modelo de hiperfenilalaninemia inibe a atividade da GSH-Px, que degrada a água oxigenada e outros peróxidos utilizando GSH e selênio (Se) como cofactores, o AL impede essa inibição. É sabido que Phe inibe GSH-Px *in vitro* e *in vivo* (Hagen et al., 2002). Além deste efeito, o AL tem a capacidade de aumentar a GSH (Packer et al., 1995, Packer et al., 1997), que é um cofator essencial da GSH-Px, ajudando a aumentar a atividade da enzima. O ácido diidrolípico, um derivado AL, também serve como um doador de elétrons glutaciona peroxidase, uma vez que é um ditiol composto (Cao e Phillis, 1995). Considerando que pacientes de PKU sob tratamento podem apresentar deficiência em Se (Wilke et al., 1992, Serra et al., 1998), a ação de AL nestes mecanismos de restauração da atividade da GSH-Px pode ser muito importante. A última enzima antioxidante avaliada neste trabalho foi G6PD, que diminuiu sua atividade no grupo Phe. G6PD é uma enzima da via das pentoses fosfato que gera NADPH como um produto final (Leong e Clark, 1984), um importante complexo de ser utilizados para reciclagem de GSH glutaciona oxidada (GSSG) pela enzima glutaciona redutase (GR). Portanto, a preservação da atividade G6PD pelo AL também é outro fator importante para manter os sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos funcionando normalmente.

O potencial antioxidante total e o conteúdo de glutaciona das amostras estavam diminuídos no cérebro ratos com hiperfenilalaninemia. Este efeito foi inibido no grupo que recebeu o pré-tratamento de AL e os níveis de GSH ainda aumentou no grupo que recebeu somente AL. A diminuição no TRAP e no conteúdo de GSH causada por acúmulo de Phe

nos animais sugere que um aumento de radicais livres possa estar presente comprometendo a capacidade antioxidante das amostras. Hagen e colaboradores (2002) observaram o mesmo efeito, *in vivo* e *in vitro* experimentos. O aumento de TRAP (parâmetro inespecífico de antioxidantes não-enzimáticos) nos grupos que receberam AL pode ser devido à sua capacidade de interagir e melhorar a ação de outros antioxidantes, como a vitamina E, vitamina C, tioredoxina, ubiquinol e na reciclagem da glutatona, já que o ácido diidrolipóico possui atividade como tiol redutase (Packer et al., 1995, Packer et al., 1997). O conteúdo de GSH encontrou-se diminuído no grupo hiperfenilalaninêmico e foi restaurado aos níveis normais nos ratos que receberam tratamento prévio AL. Curiosamente, sabe-se que AL induz a expressão da enzima de γ -glutamil-cisteína ligase (GCL- γ) que é uma enzima limitante na síntese GSH (Bharath et al., 2002, Suh et al., 2004), e que DHAL tem a capacidade de reciclar GSH como mencionado acima.

Para avaliar dano oxidativo a lipídios, TBA-RS foi determinado e os dados mostraram que Phe aumenta significativamente este parâmetro. Aumento na formação de malondialdeído, um produto da peroxidação lipídica, foi detectado no plasma de pacientes com fenilcetonúria (Sirtori, et al., 2005, Sitta et al., no prelo). Muitos estudos têm demonstrado que ambos AL e DHAL são capazes de eliminar espécies reativas (Scott et al., 1994, Packer et al., 1995), por isso, é plausível que estes compostos possam inibir a lipoperoxidação que é desencadeada por diversas espécies reativas. Por outro lado, a diminuição da defesa antioxidante causada por Phe poderia ser responsável pela redução na capacidade scavenger de muitos radicais livres, principalmente radicais hidroxila, no grupo com hiperfenilalaninemia.

Também foi observado que a diminuição na capacidade de interceptar radical hidroxila causada pela hiperfenilalaninemia não foi inibida pelo pré-tratamento com AL.

Segundo a Teichert e Preiss (1992), de 21% a 45% do ácido lipóico administrado é convertido a diidrolipoico e este composto não elimina radicais hidroxila gerados pelo sistema contendo peróxido de hidrogênio, íons Fe e ascorbato provavelmente porque DHAL aumenta a eficácia deste sistema mantendo as fontes de ascorbato como redutor (Scott et al., 1994, Packer et al., 1995). Não podemos afirmar que os resultados observados no grupo Phe + AL relacionadas à capacidade de eliminar radical hidroxila é devido a este fato, mas é uma possibilidade plausível para explicar a não prevenção do AL.

O último parâmetro analisado foi a formação de DCF que representa um índice inespecífico de produção de espécies reativas. O modelo de hiperfenilalaninemia aumentou a concentração destes compostos confirmando que a Phe gera uma superprodução espécies reativas. Os ratos que receberam AL mantiveram a produção de espécies reativas em níveis semelhante ao dos controles, e este efeito observado em nosso estudo deve ser devido à capacidade do AL e DHAL para neutralizarem radicais livres específicos e outras espécies reativas como peróxido de hidrogênio e o oxigênio singlete (Packer et al., 1995, Packer et al., 1997).

Além disso, foi analisada a capacidade do ácido lipóico em impedir as alterações provocadas pela Phe sobre os mesmos parâmetros de estresse oxidativo *in vitro*. E essa proteção foi verificada considerando a atividade das enzimas antioxidantes, TRAP, e DCF. Estes efeitos também foram observados nos últimos experimentos *in vivo*. Portanto, podemos supor que os mecanismos responsáveis pela proteção do AL também em homogeneizado, confirmando a hipótese de um mecanismo de ação direto do AL. Por outro lado, o AL não foi capaz de impedir as alterações provocadas pela Phe no conteúdo de GSH, TBA-RS, e na capacidade de interceptar radicais hidroxilas.

Já no segundo capítulo foram realizados os dois tipos de experimentos, *in vitro* e *in vivo*, para determinar o dano protéico gerado pela fenilalanina e o efeito protetor do AL frente a essa toxicidade. Além disso, foram realizadas curvas de concentração de AL e de Phe a fim de definir as concentrações a serem usadas em todos os experimentos *in vitro* realizados. E pelos resultados demonstrados é possível perceber que nem no modelo de hiperfenilalaninemia tampouco nos experimentos *in vitro* foi gerado dano protéico em termos de conteúdo de carbonilas formadas e de grupos tióis totais. Este resultado sugere que o tempo de exposição das amostras a Phe não foi suficiente para a formação de dano em nível de proteínas contidas. Possivelmente em um modelo crônico de fenilcetonúria seja possível observar esse efeito uma vez que somente pacientes tardiamente tratados apresentaram formação de dano protéico (Sitta et al., no prelo).

As curvas de Phe e de AL foram realizadas através da técnica de TBA-RS para serem avaliadas concentrações, de Phe capaz de gerar maior dano e de AL que não alterasse os níveis do controle. Tendo em vista que o cérebro é altamente susceptível ao dano lipídico devido, entre outros, às baixas defesas antioxidantes, alto consumo de oxigênio e alta quantidade de lipídios no SNC, possivelmente o primeiro tipo de dano a ser gerado será a lipoperoxidação. Os resultados mostram que as concentrações de 10 e 20 mM de Phe foram aquelas capazes de gerar dano lipídico, sendo assim a concentração final de 20 mM foi escolhida para os experimentos a fim de garantir a geração do dano. Já no caso da curva de AL é possível perceber que as concentrações de 0,01 e de 0,1 mM foram as concentrações que não alteraram os níveis do controle, a concentração de 0,1 mM foi escolhida para os experimentos *in vitro* para garantir que os efeitos gerados pela toxicidade da Phe pudessem ser revertidos no pré-tratamento com essa concentração de AL. Além

disso, alguns trabalhos mostram a eficácia desta concentração de AL para experimentos *in vitro* (Tirosh et al., 1998, Bharath et al., 2002).

Assim, pode-se dizer que a Phe gerou estresse oxidativo nas amostras submetidas a hiperfenilalaninemia, ou seja, causou um desequilíbrio entre a quantidade de oxidantes e antioxidantes em favor das moléculas oxidantes (Halliwell and Gutteridge, 2007), o que pode potencialmente levar a danos. Em condições normais existe um equilíbrio entre a geração de espécies reativas e sua remoção por agentes antioxidantes que é a homeostase redox cujo principal mecanismo é a sinalização redox que leva a uma cascata de sinais a fim de induzir a expressão de enzimas antioxidantes e o aumento dos níveis glutathiona intracelular (Dröge, 2002). De acordo com Halliwell e Gutteridge (2007), os antioxidantes são substâncias que em baixas concentrações são capazes de competir com substratos oxidáveis inibindo sua oxidação. O AL e sua forma reduzida, DHAL são consideradas antioxidantes idéias, pois interceptam diretamente radicais livres específicos e metais, interagem com outros antioxidantes e induzem expressão gênica de enzimas antioxidantes (Packer et al., 1995). Devido à baixa concentração de AL no organismo, a sua suplementação exógena por um tratamento em condições de estresse oxidativo tem sido bem sucedida em muitos casos (Packer et al., 1995, Packer et al., 1997, Hermes-Lima, 2004).

O modelo de hiperfenilalaninemia induziu estresse oxidativo no cérebro de ratos Wistar, indicando que provavelmente há um envolvimento do dano oxidativo na fisiopatologia da doença. Segundo os dados apresentados neste trabalho, um tratamento antioxidante pode ser importante para evitar o estresse oxidativo promovido pela fenilcetonúria, já que o pré-tratamento sugerido com AL demonstrou-se eficaz na melhoria da atividade de enzimas antioxidantes, aumentando as defesas antioxidantes não-

enzimáticas, na redução do dano lipídico e espécies reativas produzidas. Considerando que o tratamento normalmente exigido para a PKU que é uma dieta restrita e pobre em antioxidantes (Van Bakel et al., 2000; Schulpis et al., 2005), provavelmente uma dieta suplementada com AL deve ser uma terapia complementar melhor a estes pacientes, uma vez que ela pode melhorar a homeostase redox. Estudos devem ser realizados para compreender como Phe induzir estresse oxidativo e como o AL o previne e se estes resultados forem observados em pacientes, uma dieta suplementada com antioxidantes pode ser importantes no tratamento fenilcetonúria.

Conclusões

De acordo com os resultados obtidos no trabalho podemos concluir que:

1. O pré-tratamento com 100 mg/Kg ácido lipóico foi eficaz na proteção contra geração de estresse oxidativo em cérebro de ratos no modelo agudo de hiperfenilalaninemia, visto que preveniu a diminuição da capacidade antioxidante enzimática e não-enzimática, e aumento da lipoperoxidação e de radicais gerados pelo acúmulo de Phe.
2. O ácido lipóico *in vitro* foi capaz de prevenir a inibição de enzimas antioxidantes causada pela toxicidade da fenilalanina além da diminuição de antioxidantes totais e do aumento de espécies reativas, porém a concentração utilizada de AL não se mostrou eficaz em reverter efeitos gerados na quantidade de GSH intracelular, na capacidade de eliminar radicais hidroxilas e o dano lipídico gerado.
3. Os modelos experimentais estudados *in vivo* e *in vitro* não foram capazes de gerar dano protéico em termos de conteúdo de grupos carbonilas e sulfidrilas.
4. Sendo assim, concluímos que o estresse oxidativo gerado pelo acúmulo de Phe pode ser prevenido pelo ácido lipóico, principalmente *in vivo*. É importante salientar que muitos estudos ainda devem ser realizados antes que se possa sugerir uma dieta suplementada com AL a fim de avaliar os possíveis efeitos gerados por uma suplementação, mas uma dieta acrescida de ácido lipóico pode vir a ser uma alternativa adicional no tratamento de pacientes fenilcetonúricos.

Perspectivas

1. Avaliar o efeito do AL em um modelo crônico de fenilcetonúria em termos de estresse oxidativo.
2. Produzir uma dieta acrescida de AL e analisar a possível proteção gerada em modelos de ratos fenilcetonúricos.
3. Avaliar possíveis danos em termos de comportamento e cognição causados pela administração crônica de α -MePhe e Phe com e sem pré-tratamento com ácido lipóico.
4. Analisar a formação de dano de DNA em modelos animais de PKU.
5. Identificar possíveis mecanismos de sinalização celular utilizados pelo AL em modelos de PKU.

Referências Bibliográficas

Agostini C., Harvie A., MacCulloch D.L., Demellweek C., Cockbum F., Giovannini M., Murray G., Harkness R.A. and Riva E. (2006) A randomized trial of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation in infants with phenylketonuria. *Dev. Med. Child. Neurol.* 48, 207-212.

Aksenov M.Y. and Markesbery W.R. (2001) Changes in thiol content and expression glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 302, 141-145.

Alvord E.C., Stevenson L.D., Vogel F.S. and Engle R.L. (1950) Neuropathological findings in phenylpyruvic oligophrenia (phenylketonuria). *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 9, 298-310.

Arivazhagan, P., Panneerselvam, C., 2000. Effect of dl- α -lipoic acid on neural antioxidants in aged rats. *Pharmacol. Res.* 42, 219–222.

Artuch R., Colomé C., Sierra C., Brandi N., Lambruschini J.C., Urgate D. and Vilaseca M.A. (2004) A longitudinal study of antioxidant status in phenylketonuric patients. *Clin. Bioch.* 37, 198-203.

Bharath S, Cochran BC, Hsu M, Liu J, Ames BN, Andersen JK (2002) Pre-treatment with R-lipoic acid alleviates the effects of GSH depletion in PC12 cells: implications for Parkinson's disease therapy. *Neurotoxicology*, 23, 479–486.

Bauman M.L. and Kemper T.L. (1982) Morphologic and histoanatomic observation of the brain in untreated human phenylketonuria. *Acta Neuropathol.* 58, 55-63.

Bedin M., Estrella C.H., Ponzi D., Duarte D.V., Dutra-Filho C.S., Wyse A.T., Wajner M. and Wannmacher C.M. (2001) Reduced Na(+),K(+)-ATPase activity in 55 erythrocyte membranes from patients with phenylketonuria. *Pediatr. Res.* 50, 56-60.

Behl C. and Moosmann B. (2002) Antioxidant neuroprotection in alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 182-191.

Bergendi L., Benes L., Durackova Z. and Ferencik M. (1999) Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences* 65, 1865-1874.

Berger R., Springer J. and Hommes F.A. (1980) Brain protein and myelin metabolism in young hyperphenylalaninemic rats. *Mol. Cell Biol.* 26, 31-36.

Biewenga, G. P.; Haenen, G. R. M. M.; Bast, A. (1997) The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen. Pharmacol.* 29:315-331.

Blass J.P. Inborn errors of pyruvate metabolism. In: Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein J.L., Brown M.S. (Ed.) *The metabolic basis of inherited disease.* New York: Mc Graw Hill, 1983, 193-203.

Boveris A. (1998) Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina* (Buenos Aires) 58, 350-356.

Burlina A.B., Bonafé L., Ferrari V., Suppiej A., Zacchello F., Burlina A.P. (2000) Measurement of neurotransmitter metabolites in the cerebrospinal fluid of phenylketonuric patients under dietary treatment. *J. Inherit Metab Dis*, 23, 313-316.

Cao, X., Phillis, J.W., 1995. The free radical scavenger, alpha-lipoic acid, protects against cerebral ischemia-reperfusion injury in gerbils. *Free Radic. Res.* 23(4), 365 – 70.

Carreau, J.P., Lapous D., Raviin J. (1977) Significance of essential fatty acids in intermediary metabolism. Hypothesis on lipoic acid synthesis. *Biochimie* 59, 486-487.

Centerwall S.A. and Centerwall W.R. (2000) The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two retard children, and a scientist. *Pediatrics* 105, 89-103.

Chen L., Woo S.L. (2005) Complete and persistent phenotypic correction of phenylketonuria in mice by site-specific genome integration of murine phenylalanine hydroxylase cDNA. *Proc Natl Acad Sci*, 102, 15581-15586.

Clague A. and Thomas A. (2002) Neonatal biochemical screening for disease. *Clin. Chim. Acta.* 315, 99-110.

Clark J.B., Bates T.E., Cullingford T., Land J. M. (1993) Development of enzymes of energy metabolism in neonatal mammalian brain. *Dev Neurosci*, 15, 174-180.

Cohen M.V. (1989) Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this the time for clinical trials? *Ann. Inter. Med.* 111, 918-931.

Colomé C., Sierra C., Vilaseca M.A. (2000) Errores congénitos del metabolismo: causa de estrés oxidativo? *Med Clin*, 115, 111-117.

Colomé C., Artuch R., Vilaseca M.A., Sierra C., Brandi N., Cambra F.J., Lambruschini N. and Campistol J. (2002) Ubiquinone-10 content in lymphocytes of phenylketonuric patients. *Clin. Biochem.* 35, 81-84.

Colomé C., Artuch R., Vilaseca M.A., Sierra C., Brandi N., Lambruschini N., Cambra F.J. and Campistol J. (2003) Lipophilic antioxidants in patients with phenylketonuria. *Am. J. Clin. Nutr.* 13, 2561-2564.

Costabeber E., Kessler A., Dutra-Filho C.S., Wyse A.T.S., Wajner M. and Wannmacher C.M. (2003) Hyperphenylalaninemia reduces creatine kinase activity in the cerebral cortex of rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 21, 116-116.

D' Amico, M.L., Navari-Izzo, F., Sgherri, C., Izzo, R., 2004. The role of lipoic acid in the regulation of the redox status of wheat irrigation with 20% sea water. *Plant Physiology and Biochemistry* 42, 329-334.

Desviat I.R., Perez B., Ugarte M. (2006) Identification of exonic deletions in the PAH gene causing phenylketonuria by MLPA analysis. *Clin Chim Acta*, 373, 164-167.

Dröge, W. (2002) Free radicals in physiology control of cell function. *Physiol. Rev*, 82, 47-95.

Esterbauer H. and Cheeseman K.H. (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 186, 407-421.

Ferreira A.L. and Matsubara L.S. (1997) Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Ver. Ass. Med. Brasil* 43, 61-68.

Frazier D.M., Millington D.S., Mc Candless S.E., Koeberl D.D., Weavil S.D., Chaing S.H., Muenzer L. (2006) The tandem mass spectrometry newborn screening experience in North Carolina: 1997-2005. *J. Inherit Metab Dis*, 29, 76-85.

Fridovich I. (1975) Superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.* 44, 147-157.

Fuchs, J., Schofer, H., Milbradt, R., Freisleben, H.J., Buhl, R., Siems, W., Grune, T., 1993. Studies on lipoate effects on blood redox state in human immunodeficiency virus infected patients. *Arzneimit. Forsch.* 43, 1359–1362.

Gómez A., Wang L., Straub M., Patch M.G. and Stevens R.C. (2004) Toward PKU enzyme replacement therapy: PEGylation with activity retention for three forms of recombinant phenylalanine hydroxylase. *Molec. Therapy* 9, 124-129.

Greengard O., Yoss M.S. and Delvalle J.A. (1976) α -Methylphenylalanine, a new inducer of chronic hyperphenylalaninemia in suckling rats. *Science* 192, 1007-1008.

Gropper S.S., Yannicelli S., White B.D. and Medeiros D.M. (2004) Plasma phenylalanine concentrations are associated with hepatic iron content in a murine model for phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* 82, 76-82.

Hagen, T.M., Ingersoll, R.T., Lykkesfeldt, J., Liu, J., Wehr, C.M., Vinarsky, V., Bartholomew, J.C., Ames, B.N., 1999. (R)- α -lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *Faseb J.* 13, 411-418.

Hagen M.E.K., Pederzoli C.D., Sgaravatti A.M., Bridi R., Wajner M., Wannmacher C.M., Wyse A.T. and Dutra-Filho C.S. (2002) Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. *Biochem. Biophys. Acta.* 1586, 344-352.

Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4^o edição. New York: Oxford University Press.

Halliwell B. and Whiteman M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damages in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142, 231-255.

Hanley W.B. (2004) Adult Phenylketonuria. *Am J. Med.* 117, 590-595.

Harding C., Gillingham M.B., Hamman K., Clark H., Goebel-Daghighi E, Bird A. (2006) Complete correction of hyperphenylalaninemia following liver-directed, recombinant AAV2/8 vector-mediated gene therapy in murine phenylketonuria. *Gene Ther.* 13, 457-462.

Hermes-Lima M. (2004) Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals. In: *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation.* Storey K.S. (Ed.). John Wiley & Sons, Inc., 12, 319-368.

Hommes F.A. (1989) The role of blood-brain barrier in the aetiology of permanent brain dysfunction in hyperphenylalaninemia. *J. Inher. Metabol. Dis.* 12, 41-46.

Hommes F.A., Polman H.A., Patrick A.D. (1968) Leigh's encephalomyelopathy: An inborn error of gluconeogenesis. *Arch. Dis. Childhood.* 43, 423-426.

Hommes F.A., Eller R.G. and Taylor E.H. (1982) The effects of phenylalanine on myelin metabolism in adolescent rats. In: Cockburn F., Gitzelmann R. (editores). *Inborn Errors of Metabolism in Human: MTP Press, Lancaster,* 193-199.

Hvas A.M., Nexø E. and Nielsen J.B. (2006) Vitamin B12 and vitamin B6 supplementation is needed among adults with phenylketonuria (PKU). *J. Inher. Metab. Dis.* 29, 47-53.

Jervis G.A. (1947) Studies on phenylpyruvic oligophrenia. The position of the metabolic error. *J. Biol. Chem.* 169, 651-656.

Knox W.E. (1972) Phenylketonuria. In Stanbury J.B., Wyngaarden J.B., Fredrickson D.S. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. MacGraw-Hill, New York.

Kohli S., Saxena R., Thomas E., Rao P. and Verma I.C. (2005) Prenatal diagnosis of phenylketonuria. *Indian. J. Med. Res.* 122, 400-403.

Kozak L., Hrabincova E., Kintř J., Horky O., Zapletalova P., Blahakova I. (2006) Identification and characterization of large deletions in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene by MLPA: evidence for both homologous and non-homologous mechanisms of rearrangement. *Mol Genet Metab*, 89, 300-309.

Leong SF Clark JB (1984) Regional enzyme development in rat brain. Enzymes associated with glucose utilization. *Biochem J*, 218, 131-138.

Lodge, L., Handelman, G. J., Konishi, T., Matsugo, S., Mathur, V. V., and Packer, L. (1997). Natural sources of lipoic acid: Determination of lipoyllysine released from protease-digested tissues by high performance liquid chromatography incorporating electrochemical detection. *J. Appl. Nutr.* 49, 3-11.

Lombeck I., Jochum F. and Terwolbeck K. (1996) Selenium status in infants and children with phenylketonuria and in maternal phenylketonuria. *Eur. J. Pediatr.* 146, 32-37.

Longhi R., Rottoli A., Vittorelli A., Zecchini G., Bonabitacola T., Bertasse F., Riva E. and Giovannini M. (1987) Trace elements nutritive in hyperphenylalaninemic patients. *Eur. J. Pediatr.* 146, 32-37.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Lucok M., Yates Z., Hall K., Leeming R., Rylance G., MacDonald A. (2002) The impact of phenylketonuria on folate metabolism. *Mol Genet Metab*, 76, 305-312.

Malaton R., Stumpf D.A., Michals K., hart R.D., Parks J.K., Goodman S.I. (1984) Lipoamide dehydrogenase deficiency with primary lactic acidosis: Favorable response to treatment with oral lipoic acid. *J. Pediatr.*, 104, 65-69.

Marks D.B., Marks A.D. and Smith C.M. (1996) *Basic medical biochemistry: Williams & Wilkins, Baltimore*, 336.

Martinez-Cruz F., Pozo D., Osuna C., Espinar A., Marchante C. and Guerrero J.M. (2002) Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: prevention by melatonin, vitamin E and Vitamin C. *J. Neurosci. Res.* 69, 550-558.

McCord J.M. and Fridovich I. (1969) Superoxido dismutase: an enzymic function for eruthrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.

Moini, H., Tirosh, O., Park, Y. C., Cho, K. J. & Packer, L. (2002) R- α -lipoic acid action on cell redox status, the insulin receptor, and glucose uptake in 3T3--L1 adipocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 384--391.

Moyano D., Vilaseca M.A., Pineda M., Campistol J., Vernet A., Póo P., Artuch R. and Sierra C. (1997) Tocoferol in inborn errors intermediary metabolism. *Clin. Chim. Acta.* 263, 147-155.

Muthuswamy, A.D., Vedagiri, K., Ganesan, M., Chinnakannu, P., 2006. Oxidative stress-mediated macromolecular damage and dwindle in antioxidant status in aged rat brain regions: role of L-carnitine and DL- α -lipoic acid. *Clinica Chimica Acta* 368, 84-92.

Nyhan W.I. (1979) Phenylketonuria. In Bergsma D. (editor) *Birth defects compendium*, 2^a edição, Alan. R. Liss. Inc., New York, 866-867.

Nyhan W.I. (1984) *Abnormalities in amino acid metabolism in clinical medicine*. Appleton-century_crofts, Norwalk, 129-148.

Oh H.J., Park E.S., Kang S., Jo I., Jung S.C. (2004) Long-term enzymatic and phenotypic correction in the phenylketonuria mouse model by adeno-associated virus vector-mediated gene transfer. *Pediatr Res*, 56, 278-284.

Packer, L., Wiltf, E.H., Tritschler, H.J., 1995. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine* 19 (2), 227-250.

Packer, L., Tritschler, H.J., Wessel K., 1997. Neuroprotection by the metabolic antioxidant α -lipoic acid. *Free Radical Biology and Medicine* 22, 359-378.

Pardridge WM. Blood-brain barrier carrier mediated transport and brain metabolism of amino acids. *Neurochem Res* 1998; 23: 635-44.

Pietz J., Kreis R., Rupp A., Mayatepek E., Rating D., Boesch C. and Bremer H.J. (1999) Large neural amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *J. Clin. Inves.* 103, 1169-1178.

Pollitt R.J. (2006) International perspectives on newborn screening. *J. Inherit. Metab. Dis.* 29, 390-396.

Prohaska J., Oh S.H., Hoekstra W.G. and Ganther H.E. (1977) Glutathione peroxidase: inhibition by cyanide and release of selenium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 64-71.

Reznic A.Z., Kagan V.E., Ramsey R. (1992) Antioxidant effects L-propionyl carnitine protection of the heart against ischemia – reperfusion injury: the possible role of iron chelation. *Arch Biochem Biophys*, 296, 394-401.

Reznick A.Z. and Packer L. (1993) Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. In Poli G., Albano E., Dianzani M.U. (editores). *Free Radicals: from basic Science to Medicine*: Basel, Birkhäuser Verlag, 425-437.

Reznick A.Z. and Packer L. (1994) Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods enzymol*, 233, 357-363.

Roy, S., Sen, C.K., Tritschler, H.J., Packer, L., 1997. Modulation of cellular reducing equivalent homeostasis by α -lipoic acid. Mechanisms and implications for diabetes and ischemic injury. *Biochem. Pharmacol.* 53, 393–399.

Samuel, S., Kathirvel, R., Jayavelu, T., Chinnakkannu, P., 2005. Protein oxidative damage in arsenic induced rat brain: influence of DL- α -lipoic acid. *Toxicology Letters* 155, 27-34.

Salvador M. and Henriques J.A.P. (2004) *Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo*. 1ª edição. Canoas, RS: editora da Ulbra.

Santos L.L., Magalhães M.C., Januário J.N., Aguiar M.J.B. and Carvalho M.R.S. (2006) The time has come: a new scene for PKU treatment. *Genetics and Molec. Res.* 1, 33-44.

Sarkissian C.N. and Gámez A. (2005) Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria, where are we now? *Mol. Genet. Metab.* 86, S22-S26.

Seaton, T.A., Jenner, P., Marsden, C.D., 1996. The isomers of thioctic acid alter ¹⁴C-deoxyglucose incorporation in rat basal ganglia. *Biochem. Pharmacol.* 51, 983–986.

Schulpis K.H., Kariyannis C. and Papassotiriou I. (2004) Serum levels of neural protein S-100B in phenylketonuria. *Clin. Biochem.* 37, 76-79.

Schulpis K.H., Tsakiris S., Traeger-Synodinos J. and Papassotiriou I. (2005) Low total antioxidant status is implicated with high 8-hydroxy-2-deoxyguanosine serum concentrations in phenylketonuria. *Clin. Biochem.* 38, 239-242.

Scott B.C., Aruoma O.I., Evans P.J. O'Neill C., van der Vliet A., Cross C.E., Trtschler H., Halliwell B. (1994) Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants: A critical evaluation. *Free Rad. Res.*, 20, 119-133.

Scriver C.R. and Clow C.L. (1980) Phenylketonuria: Epitome of human biochemical genetics. *New Engla. J. Med.* 303, 1336-1342.

Scriver C.R. and Kaufman S. (2001) Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. In Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Walle D. (editores). *The Metabolic & Molecular Inherited Disease*. 8^a ed. Volume II. New York: McGraw-Hill. Cap. 77, 1667-1724.

Shah S., Peterson N.A. and Mc Kean C.M. (1972) Lipid composition of human cerebral white matter and myelin in phenylketonuria. *J. Neurochem.* 19, 2369-2376.

Sierra C., Vilaseca M.A., Moyano D., Brandi N., Campistol J., Lambruschini N., Cambra Fco. J., Deulofeu R. and Mira A. (1998) Antioxidant status in hyperphenylalaninemia. *Clin. Chim. Acta.* 276, 1-9.

Sies H. (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Bio. Med.* 27, 916-921.

Sirtori L.R., Dutra-Filho C.S., Fitarelli D., Sitta A., Haeser A., Barschak A.G., Wajner M., Coelho D.M., Llesuy S., Belló-Klein A., Giugliani R., Deon M. and Vargas C.R. (2005) Oxidative stress in patients with phenylketonuria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1740, 68-73.

Sitta A., Barschak A.G., Deon M., Terroso T., Pires R., Giugliani R., Dutra-Filho C.S., Wajner M. and Vargas C.R. (2006) Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. *Metab. Brain Dis.* 4, 287-296.

Sitta A., Barschak A.G., Deon M., Barden A.T., Biancini G.B., Vargas P.R., de Souza C.F., Netto C., Wajner M., Vargas C.R. (1999) Effect of short and long-term exposition to high phenylalanine blood levels on oxidative damage in phenylketonuric patients. *Int J. Devel Neuroscience*, in press.

Suh, J.H., Shenvi, S.V., Dixon, B.M., Liu, H., Jaiswal, A.K., Liu, R., Hagen, T.M., 2004. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *PNAS* 101 (10), 3381-3386.

Sumathi, R., Baskaran, G., Varalakshmi, P., 1996. Effect of DL α -lipoic acid on tissue redox state in acute cadmium-challenged tissues. *Nutritional Biochemistry* 7, 85-92.

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

Taylor E.H. and Hommes F.A. (1983) Effect of experimental hyperphenylalaninemia on myelin metabolism at later stages of brain development. *Int. J. Neurosc.* 20, 217-228.

Tirosch O, Sen CK, Roy S, Kobayashi MS, Packer L. (1999) Neuroprotective effects of alpha-lipoic acid and its positively charged amide analogue. *Free Radic Biol Med*, 26:1418–26.

Tourian A. and Sidbury J.B. (1983) Phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. In Stanbury J.B., Wyngaarden J.B., Fredrickson D.S. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. 5^a edição. MacGraw-Hill, New York.

Trefz F.K., Scheible D., Frauendienst-Egger G., Korall H. and Blau N. (2005) Longterm treatment of patients with mild and classical phenylketonuria by tetrahydrobiopterin. *Mol. Genet. Metab.* 86, S75-S80.

van Backel M.M., Printzen G., Wermuth B. and Wiesmann U.N. (2000) Antioxidant and thyroid hormone status in selenium-deficient phenylketonuric and hyperphenylalaninemic patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 976-981.

Wajner M., Latini A., Wyse A.T. and Dutra-Filho C.S. (2004) The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J. Inherit. Metabol. Dis.* 27, 427-448.

Wannmacher C.M.D. (1995) Estudos experimentais sobre a patogênese de erros inatos do metabolismo. Tese apresentada para a obtenção de grau de Doutor ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica. UFRGS, Porto Alegre, RS.

Wilke B.C., Vidailhet M., Favier A., Guillemin C., Ducros V., Arnaud J. and Richard M.J. (1992) Selenium, glutathione peroxidase (GSH-Px) and lipid peroxidation products before and after selenium supplementation. *Clin. Chim. Acta.* 207, 137-142.

Williams R.A., Mamotte C.D.S., Burnett, J.R. (2008) Phenylketonuria: An inborn error of phenylalanine metabolism. *Clin Biochem Rev*, 29, 31-41.

Wyse A.T.S., Bolognese G., Brusque A.M., Wajner M. and Wannmacher C.M.D. (1995) Na⁺, K⁺ -ATPase activity in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats subjected to chemically induced phenylketonuria. *Med. Sci. Res.* 23, 261-263.

Wyse A.T.S., Sarkis J.J.F., Cunha-Filho J.S., Teixeira M.V., Schetinger M.R., Wajner M. and Wannmacher C.M.D. (1994) Effect of phenylalanine and its metabolites on APT-Diphosphohydrolase activity in synaptosomes from rat cerebral cortex. *Neurochem. Res.* 19, 1175-1180.

Zeman J., Pijackova A., Behulova J., Urge O., Saligova D. and Hyanek J. (1996) Intellectual and school performance in adolescents with phenylketonuria according to their dietary compliance. *Eur. J. Pediatr.* 155, 56-58.

Ziegler, D., Reljanovic, M., Mehnert, H., Gries, F.A., 1999. α -Lipoic acid in the treatment of diabetes polyneuropathy in Germany: current evidence from clinical trials. *Exp. Clin. Endocrin. Diab.* 107, 421-430.