

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

**EFEITO *IN VITRO* DOS ÁCIDOS FENILPIRÚVICO, FENILÁCTICO E  
FENILACÉTICO SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM  
CÉREBRO DE RATOS JOVENS**

**MIRIAN BONALDI SGARBI**

**Orientador: Dr. Carlos Severo Dutra Filho**

**Porto Alegre, 2007**

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

**EFEITO *IN VITRO* DOS ÁCIDOS FENILPIRÚVICO, FENILÁCTICO E  
FENILACÉTICO SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO  
EM CÉREBRO DE RATOS JOVENS**

**MIRIAN BONALDI SGARBI**

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

**Orientador: Dr. Carlos Severo Dutra Filho**

**Porto Alegre, 2007**

**“Quero, um dia, poder dizer às pessoas que nada foi em vão  
que o amor existe,  
que vale a pena se doar às amizades e às pessoas,  
que a vida é bela sim,  
e que eu sempre dei o melhor de mim...  
E que valeu a pena!!”**

**Mário Quintana**

A Getulio e Loureci, meus amados pais, eternos professores,  
amigos dos amigos, da família, dos vizinhos e até dos inimigos...  
pessoas de caráter, de convicções e sem preço.  
Meus pais, silenciosos na dor, humilde nas homenagens.  
Meus pais, apoio nos acertos e desacertos.  
Meus pais, trabalhadores sempre.  
A este casal, que tem fé na vida, amor pelas pessoas e pelo trabalho.  
Aos seres humanos que lutam contra seus defeitos e evoluem.

A vocês, Getulio e Loureci que tem tanta luz e um sorriso tão doce...

**O meu amor eterno**

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Carlos Severo Dutra Filho, pela orientação, paciência e amizade.

Aos demais professores do Grupo de Erros Inatos do Metabolismo, Moacir, Clóvis e Ângela, pelas críticas construtivas e sugestões.

Aos colegas e amigos dos laboratórios 34, 36 e 38 pela convivência e amizade.

As colegas e amigas Ângela e Carolina, pela paciência ao me ensinar, pelas importantes contribuições, por fazerem do meu trabalho um pouquinho do de vocês.

Aos bolsistas de iniciação científica, fundamentais para a realização deste trabalho: Bernardo, Bethânia, Bianca, Carol, Evelise, Fê, Francieli e Kátia pela dedicação e principalmente pela amizade que ultrapassou as portas do laboratório e tornou nossa convivência mais divertida.

Ao Régio por encher de alegria minha vida na parte final desta dissertação.

Aos meus sobrinhos, Samanta, Junior e Bernardo por me encantarem com seus sorrisos e, principalmente a Sá por ser minha companheirinha e não deixar nunca a solidão me ganhar.

As minhas irmãs, Vanusa e Jaqueline pela cumplicidade e incentivo.

Aos meus pais, Getulio e Loureci, pelo verdadeiro apoio financeiro, por fazerem do meu sonho o nosso sonho, pela dedicação incansável, pelo amor e confiança.

A Deus, pela saúde necessária para esta conquista, pela saúde das pessoas que amo, sem as quais este trabalho não teria sentido, pela coragem de meus pais, que superaram as dificuldades e tornaram essa dissertação possível, pela benção de ter uma família unida.

## RESUMO

A fenilcetonúria é um erro inato do metabolismo causado pela deficiência severa da atividade da enzima fenilalanina hidroxilase, a qual converte fenilalanina em tirosina. O bloqueio desta hidroxilação resulta em acúmulo tecidual de fenilalanina e seus metabólitos, ácidos fenilpirúvico, fenilático e fenilacético. Cabe salientar que a concentração cerebral destes metabólitos está correlacionada positivamente aos níveis plasmáticos de fenilalanina. A doença caracteriza-se por sintomas neurológicos graves tais como retardo mental e convulsões. Apesar de ser uma das aminoacidopatias mais freqüentes e mais estudadas, a neuropatologia da fenilcetonúria ainda não é totalmente compreendida. No presente trabalho, foram investigados os efeitos *in vitro* dos ácidos fenilpirúvico, fenilático e fenilacético sobre o estresse oxidativo em homogeneizado de cérebro de ratos jovens, a fim de melhor entender o envolvimento destes metabólitos na disfunção neurológica presente na doença. Foram estudados os seguintes parâmetros: quimiluminescência, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), potencial antioxidante total (TRAP), reatividade antioxidante total (TAR), conteúdo de tióis totais e de grupos carbonila, conteúdo de glutathiona (GSH), conteúdo de 2', 7' diclorofluoresceína (DCF) e atividade das enzimas antioxidantes: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px). Observamos que o ácido fenilpirúvico aumentou a quimiluminescência, o TBA-RS e o conteúdo de grupos carbonila, de maneira dose-dependente, ainda, este ácido reduziu o TRAP, de maneira dose-dependente, e o conteúdo de GSH. O ácido fenilático aumentou a quimiluminescência e o TBA-RS, diminuiu o TRAP e o conteúdo de GSH. Já, na presença do ácido fenilacético, houve um aumento significativo do TBA-RS e do conteúdo de DCF. Os três metabólitos testados não alteraram a atividade da enzima antioxidante SOD, porém reduziram a atividade da GSH-Px, de maneira dose-dependente, e da CAT. Os resultados obtidos mostram que os metabólitos da fenilalanina alteram parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos. Aliados a diversos estudos anteriores em modelo animal e em pacientes com fenilcetonúria, que demonstram que a fenilalanina altera parâmetros de estresse oxidativo, nossos resultados indicam que os metabólitos deste aminoácido também podem estar envolvidos na fisiopatologia dos danos cerebrais observados na fenilcetonúria, sugerindo que o benefício de uma suplementação com antioxidantes à dieta dos pacientes seja estudado a fim de prevenir possíveis danos causados por radicais livres.

## ABSTRACT

Phenylketonuria is an inborn error of metabolism caused by severe deficiency of phenylalanine hydroxylase activity, which converts phenylalanine to tyrosine, leading to tissue accumulation of phenylalanine and its metabolites (phenylpyruvic acid, phenyllactic acid and phenylacetic acid). The concentrations of these metabolites into the brain correlate positively with plasma phenylalanine levels. This disease is characterized by serious neurological features, such as mental retardation and seizures. Although phenylketonuria is one of the most frequent and studied aminoacidopatias, the neuropathology of this disease is poorly understood. In the present work, the *in vitro* effect of the phenylpyruvic acid, phenyllactic acid and phenylacetic acid on oxidative stress were investigated in brain homogenates of young rats, in order to be better understand the involvement of these metabolites in the neurological dysfunction present in this disease. The following parameters were studied: chemiluminescence, thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS), total radical-trapping antioxidant potential (TRAP), total antioxidant reactivity (TAR), total thiol and carbonyl groups, glutathione (GSH), 2', 7' dichlorofluorescein (DCF) and the activities of antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GSH-Px). We observed that phenylpyruvic acid increased chemiluminescence, TBA-RS and the content of carbonyl groups (in a dose-dependent way) and that this acid reduced TRAP (in a dose-dependent way) and GSH levels. Phenyllactic acid increased chemiluminescence and TBA-RS, and reduced TRAP and GSH levels. Phenylacetic acid increased TBA-RS and the measurement of DCF. Any of the metabolites altered the activity of SOD, whereas all of them reduced the activities of GSH-Px (in a dose-dependent way) and CAT. The results show that phenylalanine metabolites alter many parameters of oxidative stress in brain homogenates of young rats. Other studies have been demonstrated that oxidative stress seems to be involved in phenylketonuric animal models and patients. Taking together, these studies and our results suggest that the benefit of an antioxidant supplementation to the diet of these patients might be studied in order to prevent possible damage produced by free radicals.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**CAT** Catalase

**DCF** 2', 7' diclorofluoresceína

**DCFH-DA** 2', 7' diclorofluoresceína diacetato

**DHPR** Di-hidrobiopterina redutase

**ERO** Espécies reativas de oxigênio

**GR** Glutathiona redutase

**GSH** Glutathiona reduzida

**GSH-Px** Glutathiona peroxidase

**GSSG** Glutathiona oxidada

**HPA** Hiperfenilalaninemia

**LOOH** Hidroperóxido orgânico

**PHA** Fenilalanina hidroxilase

**PKU** Fenilcetonúria

**Q10** Ubiquinona-10

**SOD** Superóxido dismutase

**TAR** Reatividade antioxidante total

**TBA-RS** Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**TRAP** Potencial antioxidante total



## SUMÁRIO

<b>I. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>1. Fenilcetonúria</b>	1
1.1 Histórico	1
1.2 Metabolismo da fenilalanina	2
1.3 Causas de Hiperfenilalaninemias	3
1.4 Manifestações Clínicas	4
1.5 Diagnóstico	5
1.6 Tratamento	5
1.7 Alterações Bioquímicas e Neuropatológicas	7
<b>2. Radicais Livres</b>	10
2.1 Lipoperoxidação	11
2.2 Defesas Antioxidantes	12
2.3 Estresse Oxidativo	16
2.3.1 Estresse Oxidativo e Fenilcetonúria	17
<b>II. OBJETIVOS</b>	21
<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	22
1. Animais e Reagentes	22
2. Preparação do tecido	22
3. Incubação do homogeneizado	23
4. Quimiluminescência	23
5. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)	23

6. Potencial antioxidante total (TRAP)	24
7. Reatividade antioxidante total (TAR)	25
8. Medida de tióis totais	25
9. Medida do conteúdo de grupos carbonila	25
10. Conteúdo de GSH	26
11. Conteúdo de 2', 7' diclorofluoresceína	26
12. Medida da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)	27
13. Medida da atividade da enzima Catalase (CAT)	27
14. Medida da atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GSH-Px)	27
15. Determinação de proteínas	28
16. Análise estatística	28
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>29</b>
<b>V. DISCUSSÃO</b>	<b>42</b>
<b>VI. CONCLUSÕES</b>	<b>53</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>54</b>

## I. INTRODUÇÃO

### 1. Fenilcetonúria

A fenilcetonúria (PKU) é um dos mais freqüentes e estudados erros inatos do metabolismo. É uma doença genética de caráter autossômico recessivo com incidência de aproximadamente 1:10.000 na população caucasiana (Scriver e Kaufman, 2001).

Esta aminoacidopatia é causada por uma deficiência severa da atividade da enzima hepática fenilalanina hidroxilase (PAH), a qual catalisa a síntese de tirosina a partir da fenilalanina. Conseqüentemente, há um aumento nos níveis da fenilalanina (podendo alcançar níveis de 1 a 3 mM) e de seus metabólitos, ácido fenilpirúvico, ácido feniláctico e ácido fenilacético, nos tecidos dos pacientes (Scriver e Kaufman, 2001).

#### 1.1 Histórico

A fenilcetonúria foi descoberta por Fölling, em 1934, analisando a urina de crianças com retardo mental através do teste do cloreto férrico, que reage com o fenilpiruvato produzindo cor verde. Fölling associou os sintomas neurológicos com a presença desse metabólito da fenilalanina na urina (Centerwall e Centerwall, 2000; Nyhan, 1984). Em 1935, Penrose reconheceu a doença como sendo um novo erro inato de metabolismo (Scriver e Kaufman, 2001) e denominou-a de Fenilcetonúria,

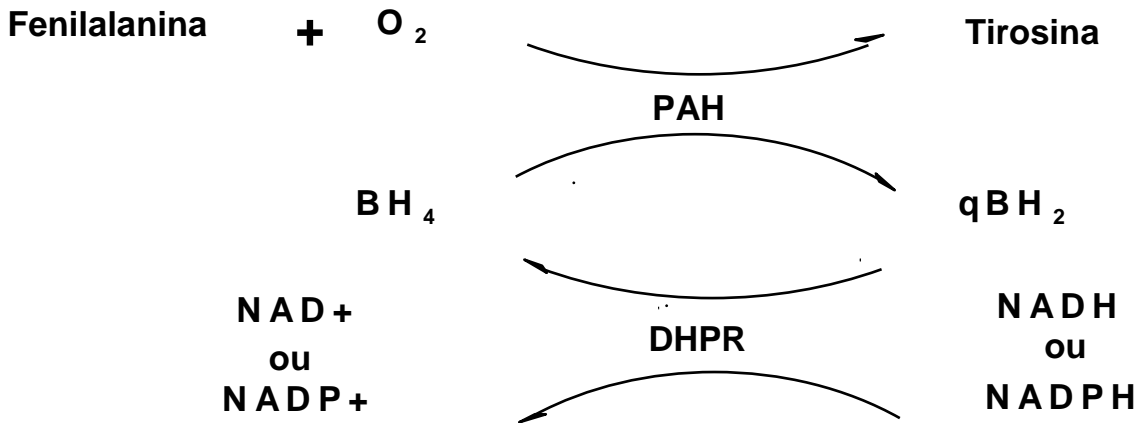
devido ao aparecimento de uma fenilcetona (ácido fenilpirúvico) na urina dos pacientes afetados (Centerwall e Centerwall, 2000).

O erro metabólico foi identificado por Jervis (1947) através de experiências que mostraram que a fenilalanina proveniente da dieta não era convertida à tirosina e, anos após, Underfriend e Cooper (1952) descobriram o sistema enzimático responsável por esta reação, a fenilalanina hidroxilase.

## 1.2 Metabolismo da fenilalanina

A fenilalanina é um aminoácido essencial que é hidroxilado à tirosina no primeiro passo de seu metabolismo pela enzima fenilalanina hidroxilase (Figura 1). Esta enzima requer ainda um cofator, a tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) (Nyhan, 1984). A reação de hidroxilação envolve quantidades equimolares de fenilalanina, BH<sub>4</sub> e oxigênio. A di-hidrobiopterina redutase (DHPR) é a enzima que catalisa a regeneração do BH<sub>4</sub>. Esta reação é dependente de NADH ou NADPH (Scriver e Clow, 1980).

A fenilalanina é convertida, por descarboxilação e transaminação, a metabólitos. O bloqueio da rota principal do catabolismo da fenilalanina provoca acúmulo desta e de seus metabólitos (fenilpiruvato, fenilactato e fenilacetato) nos tecidos dos pacientes (Scriver e Kaufman, 2001). Esses compostos são metabólitos normais, mas que estão presentes em quantidades anormais nos pacientes fenilcetonúricos (Knox, 1972; Nyhan, 1984). O catabolismo da fenilalanina está representado na figura 2.



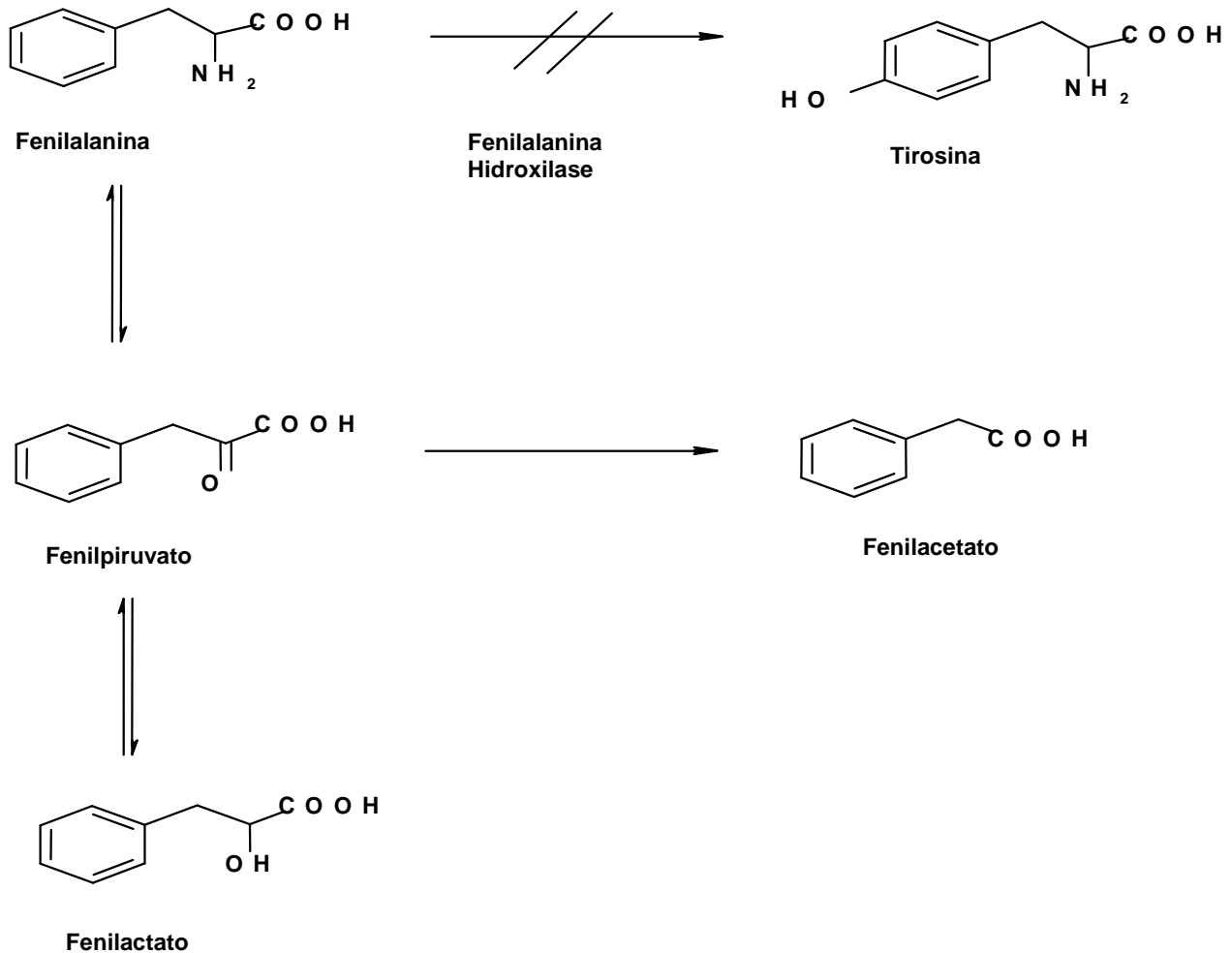
**PAH - Fenilalanina Hidroxilase**

**DHPR - Diidropteridina Redutase**

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

### 1.3 Causas de Hiperfenilalaninemias

Hiperfenilalaninemia (HPA) é definida por níveis plasmáticos de fenilalanina acima de  $120 \mu\text{M}$ . É uma condição clínica onde os níveis de fenilalanina estão anormais. Usualmente, a HPA ocorre devido a mutações no gene que codifica a enzima PHA. Mutações nos genes responsáveis pela síntese ou regeneração do  $\text{BH}_4$ , cofator da PHA, também podem ser responsáveis pelas HPA. PKU refere-se especificamente a HPAs causadas por mutações no gene da enzima PHA (Scriver e Kaufman, 2001).



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

#### 1.4 Manifestações Clínicas

Pacientes com fenilcetonúria apresentam os seguintes sintomas em maior ou menor intensidade: atraso no desenvolvimento psicomotor, hiperatividade, convulsões, alterações cutâneas tais como eczema, distúrbios de pigmentação, dificuldade para andar e falar, comportamento agressivo, hipotonicidade muscular,

tremores, microcefalia, epilepsia, hipoplasia dentária, descalcificação de ossos longos, retardo do crescimento, anormalidades no eletroencefalograma (EEG) (Jervis, 1947; Fois, Rosemberg e Gibb, 1955; Paine et al., 1957; Nyhan, 1979; Pietz et al., 1993). Dentre as manifestações neuropsiquiátricas da PKU, a mais importante é o retardo mental (Nyhan, 1984).

### 1.5 Diagnóstico

Atualmente a identificação da PKU é realizada através da triagem neonatal (Kohli et al., 2005; Clague e Thomas, 2002). A identificação dessa doença, antigamente realizada na urina dos pacientes suspeitos pelo teste do cloreto férrico, foi substituída pelo teste de inibição bacteriana em uma amostra de sangue coletada em papel filtro (Scriver e Kaufman, 2001), sendo que os testes confirmatórios para PKU são métodos cromatográficos, fluorimétricos e enzimáticos (Clague e Thomas, 2002) e espectrometria de massa (Pollitt, 2006). O diagnóstico pré-natal assume grande importância no manejo da doença, já que o dano neurológico, que pode ser prevenido pela terapia, se instalado é irreversível (Scriver e Kaufman, 2001; Kohli et al., 2005). O diagnóstico fetal para a deficiência da PHA é também factível através da análise de DNA (Scriver e Kaufman, 2001).

### 1.6 Tratamento

O tratamento da PKU consiste em uma dieta hipoprotéica, restrita em fenilalanina e enriquecida em ácidos graxos, o que permite melhorar o prognóstico dos pacientes em relação ao desenvolvimento neuropsicomotor (Santos et al., 2006; Agostini et al., 2006; Scriver e Kaufman, 2001). Esta dieta deve ser suplementada com uma fórmula de aminoácidos (isenta em fenilalanina), que contém os aminoácidos essenciais ao desenvolvimento dos pacientes. Estudos têm demonstrado que a suplementação da dieta com tetraidrobiopterina, o cofator da enzima PHA, é eficiente na redução dos níveis plasmáticos de fenilalanina em alguns casos (Santos et al., 2006; Trefz et al., 2005). Novas estratégias terapêuticas vêm sendo desenvolvidas, como a utilização via oral da enzima fenilalanina amônia-liase, que degrada a fenilalanina no trato digestivo, evitando sua absorção (Sarkissian e Gámez, 2005). Outra terapia promissora é a reposição enzimática, utilizando enzimas recombinantes da PAH, via oral ou parenteral (Gámez et al., 2004).

O grau de retardo mental está diretamente relacionado aos níveis de fenilalanina. Frequentes avaliações aconselham a manter os níveis sanguíneos abaixo de 0,3 mM (Scriver e Kaufman, 2001). Alguns estudos já avaliaram a concentração cerebral de fenilalanina, a qual, sugere-se, deva permanecer abaixo de 0,25 mM (Moats et al., 2000; Weglage et al., 2000). No entanto, alguns autores demonstraram, através de imagem por ressonância magnética e espectroscopia por ressonância magnética, que a correlação dos níveis sanguíneos e cerebrais de fenilalanina nem sempre é significativa (Moats et al., 2000; Koch et al., 2000).



O tratamento deve ser iniciado o mais cedo possível, a fim de se evitar as conseqüências neuropsiquiátricas da hiperfenilalaninemia (Zeman et al., 1996). Os pacientes fenilcetonúricos precisam continuar a dieta através da sua vida adulta e, considerando riscos, custo e benefício, uma suplementação vitamínica parece ser justificada (Hvas, Nexø e Nielsen, 2006).

### 1.7 Alterações Bioquímicas e Neuropatológicas

Acredita-se que a hiperfenilalaninemia é acompanhada por uma redução nos níveis cerebrais de tirosina e outros aminoácidos essenciais, causando um distúrbio no sistema de síntese protéica (Hommes, 1989) e alterações no processo de mielinização (Berger, Springer e Hommes, 1980). A inibição da captação de aminoácidos neutros pelo tecido nervoso por competição na barreira hematoencefálica é um mecanismo que pode estar envolvido na toxicidade da fenilalanina (Hommes, 1989; Pietz et al., 1999).

Exames *post mortem* realizados em cérebro de indivíduos fenilcetonúricos revelaram redução no peso (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). Estudos feitos com imagens obtidas através de ressonância magnética nuclear (RMN) confirmaram os achados neuropatológicos anteriores, tais como, áreas de vacuolização ou desmielinização da substância branca (Shah, Weinberger

e Maravilla, 1990). Os níveis séricos da proteína S-100B, um marcador de lesões no SNC, foram correlacionados positivamente com os níveis sangüíneos 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). Os exames de RNM têm demonstrado graves anormalidades compatíveis com desmielinização nas áreas parieto-occipital, frontal e sub-sortical (Weglage et al., 2000). Além disso, verificou-se gliose e redução da arborização dendrítica em fenilcetonúricos (Scriver e Kaufman, 2001).

Em trabalhos anteriores, realizados em nosso grupo de pesquisa, foi utilizado um modelo animal de hiperfenilalaninemia através da administração de fenilalanina e  $\alpha$ -metilfenilalanina, um inibidor da fenilalanina hidroxilase hepática (Greengard, Yoss e Delvalle, 1976). Ratos previamente tratados apresentaram uma redução na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase de membrana plasmática sináptica (Wyse et al., 1995a), aumento das atividades da piruvatoquinase (Wannmacher, 1995) e da ATP-difosfoidrolase 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 experimental em resposta a inibição de suas atividades causada pela fenilalanina. Em 2001, Bedin e colaboradores demonstraram que a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -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*.

Rodrigues e colaboradores (1990) realizaram trabalhos *in vitro* demonstrando que a fenilalanina inibe a captação de glicose no cérebro, o que pode ser devido a inibição da piruvatoquinase pela fenilalanina. Outros estudos realizados em nosso Grupo de Erros Inatos do Metabolismo demonstraram que a alanina, na presença da fenilalanina, foi capaz de reverter o efeito inibitório da fenilalanina sobre a atividade da enzima piruvatoquinase (Wannmacher, 1995; Feksa et al., 2002) e da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Wyse et al., 1995b).

Wyse e colaboradores (1998 e 1999) demonstraram que, por competição, a alanina reverte o efeito inibitório da fenilalanina e do fenilactato sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase *in vitro* e *in vivo*. Sendo assim, pode-se concluir que provavelmente ocorram alterações na atividade das enzimas estudadas em situações de hiperfenilalaninemia, contribuindo para o desenvolvimento dos distúrbios neurológicos observados na PKU.

Foi demonstrada uma redução nas atividades da succinato desidrogenase (SDH) e dos complexos I + III da cadeia respiratória mitocondrial em córtex de ratos hiperfenilalaninêmicos, e uma redução *in vitro* da atividade dos complexos I + III na presença da fenilalanina (Rech et al., 2002).

Avaliando a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em membrana de eritrócitos, Tsakiris e colaboradores (2002) concluíram que altos níveis sanguíneos

de fenilalanina inibem a AChE em pacientes com PKU, provavelmente resultando em altas concentrações de acetilcolina.

A administração do fenilpiruvato, um dos metabólitos acumulados na PKU, é capaz de induzir necrose cerebral acompanhada de disfunção neurocomportamental em camundongos recém-nascidos (Gazit et al., 2003).

A fenilalanina, em cultura de neurônios, diminui a transmissão sináptica glutamatérgica (Glushakov et al., 2003) através de competição pela ligação da glicina nos receptores NMDA, atenuação da liberação de neurotransmissores e competição pela ligação do glutamato nos receptores AMPA (Martynyuk et al., 2005).

## **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, 1999).

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 ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroperoxila ( $HO_2^{\bullet-}$ ) e hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), em pequenas quantidades na mitocôndria (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, 1999).

As espécies reativas de oxigênio, que incluem radicais e alguns não-radicais derivados do  $O_2$ , 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 conseqüências patológicas (Bergendi et al., 1999).

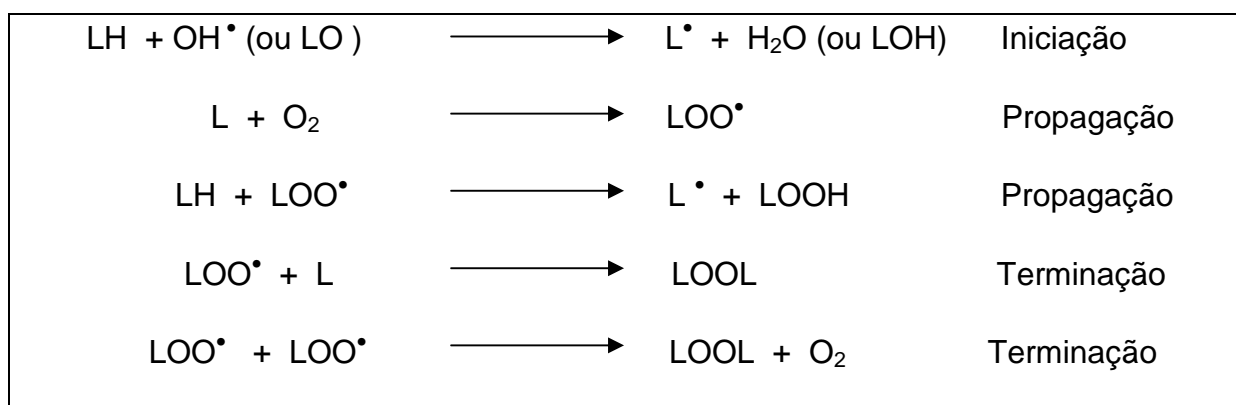
Essas espécies altamente reativas têm o potencial de oxidar moléculas como proteínas, lipídios e DNA (Halliwell e Whiteman, 2004).

## 2.1 Lipoperoxidação

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERO, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do

conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e a formação de produtos citotóxicos (como o malondialdeído), culminando com a morte celular. A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exarcebação da toxicidade de xenobióticos. Assim como na formação das ERO, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido araquidônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória. Todavia, o excesso desses produtos pode ser lesivo (Ferreira e Matsubara, 1997).

A lipoperoxidação é representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (Figura 3) (Halliwell e Gutteridge, 1999), podendo ser catalisada por íons ferro, por conversão de hidróxidos lipídicos (LOOH) em radicais altamente reativos capazes de iniciar nova cadeia de reações, denominada ramificação.



**Figura 3.** Reações de iniciação, propagação e terminação da lipoperoxidação.

Adaptado de Ferreira e Matsubara (1997).

## 2.2 Defesas Antioxidantes

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 podem ser enzimáticos ou não, e conservam a harmonia entre a produção fisiológica de ERO e sua destoxificação (Halliwell e Gutteridge, 1999; Behl e Moosmann, 2002).

Embora diferindo de tecido para tecido em sua composição, as defesas antioxidantes compreendem:

- enzimas antioxidantes: superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase.
- defesas não-enzimáticas: antioxidantes lipofílicos (tocoferóis, carotenóides e bioflavonóides) e hidrofílicos (glutathione, ácido ascórbico, indóis e catecóis) (Halliwell e Gutteridge, 1999).

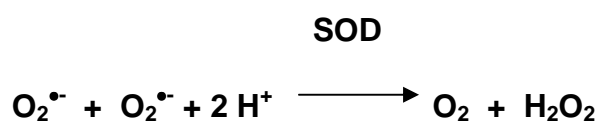
### *Enzimas antioxidantes*

- Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD catalisa a reação de dismutação de dois radicais superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio (Figura 4) 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 glutathione 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).



**Figura 4.** Dismutação do radical superóxido pela SOD.

- Catalase (CAT)

A CAT é uma hemoproteína que catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio (Figura 5) (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).



**Figura 5.** Decomposição do peróxido de hidrogênio pela CAT.

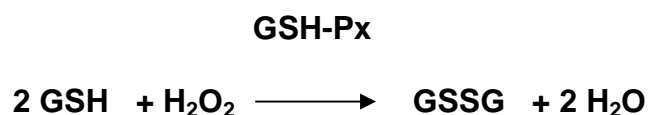
- Glutathione Peroxidase (GSH-Px)

A GSH-Px catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos para seus álcoois correspondentes (Figura 6) (Ferreira e Matsubara, 1997). O grupo sulfidrílica da glutathione reduzida (GSH) atua como doador de elétrons e é oxidado para a forma glutathione oxidada (GSSG). Há dois tipos de glutathione



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 (Figura 7) (Marks, Marks e Smith,1996).



**Figura 6.** Decomposição de peróxido de hidrogênio, ou outros lipoperóxidos, pela GSH-Px (Marks, Marks e Smith,1996).



**Figura 7.** Redução da GSSG pela GR (Marks, Marks e Smith,1996).

#### *Defesas Antioxidantes Não-Enzimáticas*

- Glutathiona

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, 1999) e tem papel na transdução de sinal, na expressão gênica e na apoptose (Sies, 1999).

Apesar de citar os demais antioxidantes não-enzimáticos, estes não serão detalhados, visto que não foram abordados neste estudo.

### 2.3 Estresse Oxidativo

Em situações normais (organismos saudáveis), a produção de espécies ativas de oxigênio e de nitrogênio, além de outros oxidantes, é aproximadamente 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 sistema nervoso. 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, sendo que o tecido nervoso é mais suscetível, em comparação a outros tecidos, devido ao alto consumo de oxigênio pelo cérebro humano (Halliwell e Gutteridge, 1999), a grande quantidade de lipídios insaturados na sua composição, deficiência em 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 enormemente a liberação de glutamato, levando ao aumento excessivo de  $\text{Ca}^{2+}$  livre intracelular e  $\text{Na}^+$  em neurônios adjacentes resultando em alta produção de  $\text{NO}^*$  e ERO (Reznick e Packer, 1993).

### 2.3.1 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.

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. Foi demonstrado posteriormente que mesmo após a suplementação com selênio, oligoelementos e vitaminas, crianças com PKU ou com hiperfenilalaninemia leve continuaram apresentando deficiência 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

com erros inatos do metabolismo energético não tratados. 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 um aumento de alguns marcadores de estresse oxidativo e uma 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 do tecido *in vitro* e *in vivo*. Além disso, também verificou-se que a fenilalanina inibe 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.

## II. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito dos metabólitos da fenilalanina, ácido fenilpirúvico, ácido feniláctico e ácido fenilacético, sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em homogeneizados de cérebro de ratos Wistar jovens, a fim de melhor compreender a etiopatogenia dos sintomas neurológicos dessa doença. Para tanto, o efeito *in vitro* destes ácidos foi investigado sobre os seguintes parâmetros:

- Quimiluminescência
- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
- Potencial antioxidante total
- Reatividade antioxidante total
- Medida de tióis totais
- Medida do conteúdo de grupos carbonilas
- Conteúdo de glutatona
- Conteúdo de 2', 7' diclorofluoresceína
- Defesas antioxidantes enzimáticas (superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase).

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1. *Animais e Reagentes*

Para a realização dos experimentos foram utilizados aproximadamente 200 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.

#### 2. *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). Em seguida, o



homogeneizado foi centrifugado a 1000g por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante usado para a medida dos parâmetros de estresse oxidativo.

### 3. *Incubação do homogeneizado*

Os homogeneizados foram incubados por 1 hora a 37°C na presença de 0,1, 0,4 ou 1,2 mM de ácido fenilpirúvico, ácido fenilático ou ácido fenilacético. Os controles foram incubados apenas com tampão de homogeneização. Para a medida das atividades enzimáticas não houve incubação prévia.

### 4. *Quimiluminescência*

Avalia a luz emitida pelo oxigênio *singlet* e carbonilas excitadas. A medida foi realizada em uma sala escura, de acordo com o método de Lissi e colaboradores (1986). Para a medida da quimiluminescência, uma alíquota de 3,5 mL do tampão de homogeneização foi adicionado a um frasco de cintilação para a contagem de quimiluminescência basal, durante 5 minutos. Após, a este mesmo frasco foram acrescentados 0,5 mL de homogeneizado, após incubação, efetuando-se a contagem da quimiluminescência, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em termos de contagens por segundo por mg de proteína (cps/mg de proteína).

### 5. *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 µL deste foram

adicionados a 300  $\mu$ L de ácido tricloroacético 10 % (TCA) e centrifugado a 300g por 10 min. Trezentos  $\mu$ L do sobrenadante foi transferido para um tubo Pyrex e incubado com 300  $\mu$ 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.

#### *6. Potencial antioxidante total (TRAP)*

Representa a capacidade antioxidante total do tecido, sendo esta determinada através da medida da intensidade de quimiluminescência do luminol induzida pela adição de 2,2'-azo-bis-(2-aminopropano) (ABAP) à temperatura ambiente (Lissi, Pascual e Del castilho, 1992; Evelson et al., 2001). O TRAP traduz, assim, a capacidade do tecido em resistir ao estresse oxidativo pela adição de uma fonte de radicais livres (ABAP) ao sistema. A quimiluminescência inicial foi obtida pela adição de 3 mL de ABAP 10 mM, dissolvidos em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4, e 10  $\mu$ L de luminol (5,6 mM) em um frasco de cintilação. Foram então acrescentados 10  $\mu$ L de Trolox 160  $\mu$ M (Vitamina E hidrossolúvel) ou de sobrenadante de amostra, e a quimiluminescência foi medida até atingir os valores iniciais. O tempo necessário para que a quimiluminescência volte aos valores iniciais é diretamente proporcional à capacidade antioxidante do tecido. O potencial

antioxidante das amostras foi calculado em relação ao potencial antioxidante medido do trolox, sendo os resultados expressos em nmol de Trolox/mg de proteína.

#### *7. Reatividade antioxidante total (TAR)*

O TAR foi determinado pela medida da intensidade da quimiluminescência do luminol, induzida pelo ABAP, de acordo com o método de Lissi e colaboradores (1995). A quimiluminescência foi medida pela adição de 4 mL de ABAP 2 mM, preparados em tampão glicina 0,1 mM pH 8,6 e 15  $\mu$ L de luminol (4 mM) em um frasco de cintilação. Esta foi considerada a leitura basal. Após 10  $\mu$ L de Trolox 20  $\mu$ M ou sobrenadante de amostra foram adicionados e a quimiluminescência foi lida durante 60 segundos. A rápida redução da intensidade do luminol foi considerada a medida da capacidade do TAR. Os resultados foram expressos em nmol de Trolox/mg de proteína.

#### *8. 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.

#### *9. 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.

#### *10. Conteúdo de GSH*

É um método fluorimétrico para determinação do conteúdo de GSH da amostra (Browne e Armstrong, 1998), o qual utiliza o-ftaldialdeído (OPT) como fluoróforo. Para a curva padrão utilizou-se GSH purificado e ácido metafosfórico. As leituras foram feitas em 350 nm e, os resultados foram expressos em mg de GSH/mg de proteína.

#### *11. Conteúdo de 2', 7' diclorofluoresceína (DCF)*

O conteúdo de DCF foi medido no homogeneizado, após incubação, como um meio de estimar a formação de espécies reativas (Oyama et al., 1994). DCFH-DA atravessa a membrana das células, onde é desacetilado a DCFH que, então, é oxidado por espécies reativas intracelulares formando um composto de alta fluorescência, o DCF. Para o cálculo dos resultados foi feita uma curva padrão com DCF, estes foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de DCF/mg de proteína.

### *12. Medida da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)*

Para a medida da atividade da SOD foi utilizado o homogeneizado, sem prévia incubação, de acordo com o método de Marklund (1985). O método baseia-se na capacidade de auto-oxidação do pirogalol, um processo altamente dependente de  $O_2$ . A inibição da auto-oxidação deste composto ocorre na presença da SOD e a atividade pode ser medida indiretamente em espectrofotômetro de feixe duplo e temperatura controlada a 420 nm. A curva de calibração foi feita com SOD purificada como padrão, a fim de calcular a atividade da SOD presente nas amostras. Os resultados foram expressos em unidades de SOD/mg de proteína. Uma unidade de SOD é definida como 50% de inibição da auto-oxidação do pirogalol.

### *13. Medida da atividade da enzima Catalase (CAT)*

A atividade da CAT foi medida de acordo com o método de Aebi (1984), que se baseia no desaparecimento do  $H_2O_2$  a 240 nm em um meio de reação contendo 20 mM de  $H_2O_2$ , 0,1 % de Triton X-100 e tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0. Para esta medida o homogeneizado não foi incubado e imediatamente foi feita a leitura, em espectrofotômetro de feixe duplo e temperatura controlada a 240 nm. Uma unidade é definida como 1  $\mu$ mol de peróxido de hidrogênio consumido por minuto, sendo a atividade específica expressa como unidades por mg de proteína.

### *14. Medida da atividade da enzima Glutathiona Peroxidase (GSH-Px)*

A atividade da GSH-Px foi medida de acordo com o método de Wendel (1981), utilizando o homogeneizado, sem prévia incubação. O desaparecimento do

NADPH foi monitorado a 340 nm em espectrofotômetro de feixe duplo e temperatura controlada. O meio continha glutathione 2 mM, glutathione reductase 0,15 U/mL, azida 0,4 mM, terc-butil-hidroperóxido 0,5 mM e NADPH 0,1 mM. Uma unidade de GSH-Px é definida como um  $\mu\text{mol}$  de NADPH consumido por minuto e a atividade específica é representada em unidades/mg de proteína.

#### *15. Determinação de proteínas*

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

#### *16. Análise estatística*

A análise estatística foi realizada pela análise de variância de uma-via (ANOVA), seguida pelo teste de Duncan para múltipla comparação quando o valor de F foi significativo. A análise de regressão linear foi feita para verificar efeitos de dose-dependência. 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).

#### IV. RESULTADOS

Inicialmente avaliamos o efeito *in vitro* dos metabólitos da fenilalanina sobre parâmetros de lipoperoxidação. A figura 8 mostra o efeito dos ácidos fenilpirúvico, feniláctico e fenilacético sobre a quimiluminescência. Pode-se observar que houve um aumento significativo da quimiluminescência nas concentrações de 0,4 e 1,2 mM de ácido fenilpirúvico, de maneira dose-dependente [ $F(3,20)=16,99$ ;  $p<0,01$ ,  $n=6$ ] [ $\beta=0,66$ ;  $p<0,001$ ] e na concentração de 1,2 mM de ácido feniláctico [ $F(3,16)=3,36$ ;  $p<0,05$ ,  $n=5$ ], enquanto que o ácido fenilacético não alterou este parâmetro [ $F(3,20)=0,52$ ;  $p>0,05$ ,  $n=6$ ]. Em adição, houve também um aumento significativo nas mesmas concentrações do ácido fenilpirúvico [ $F(3,12)=29,47$ ;  $p<0,01$ ,  $n=4$ ] de maneira dose-dependente [ $\beta=0,82$ ;  $p<0,001$ ], em 1,2 mM do ácido feniláctico [ $F(3,20)=3,24$ ;  $p<0,05$ ,  $n=6$ ] e em 1,2 mM do ácido fenilacético [ $F(3,12)=5,86$ ;  $p<0,05$ ,  $n=4$ ] sobre a medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) (figura 9). Estes resultados sugerem que estes metabólitos estimulam *in vitro* a lipoperoxidação em homogeneizado de cérebro de ratos.

Após, nós avaliamos o efeito *in vitro* dos metabólitos em cérebro total de ratos jovens sobre o TRAP e o TAR, que avaliam a quantidade e a reatividade de antioxidantes não-enzimáticos, respectivamente, presentes na amostra. A figura 10 mostra que o TRAP foi significativamente reduzido na presença de 0,4 e 1,2 mM de ácido fenilpirúvico [ $F(3,24)=19,63$ ;  $p<0,01$ ,  $n=7$ ], de maneira dose-dependente [ $\beta=-0,65$ ;  $p<0,001$ ]. Esta figura também mostra que o TRAP foi significativamente reduzido na concentração de 1,2 mM de ácido feniláctico [ $F(3,20)=3,71$ ;  $p<0,05$ ,  $n=6$ ]

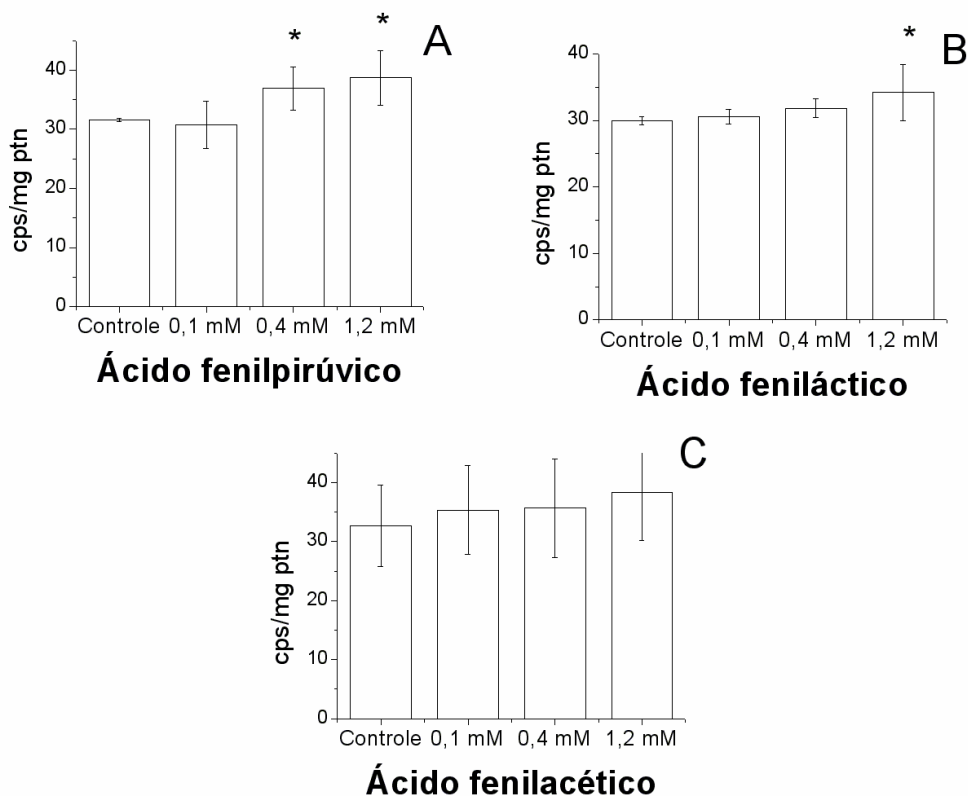


Figura 8: Efeito *in vitro* do Ácido fenilpirúvico (A), Ácido feniláctico (B) e Ácido fenilacético (C) sobre a quimiluminescência em cérebro de ratos jovens. Resultados expressos em média  $\pm$  DP [n=6 (A,C), n=5 (B)]. \*p<0,05, diferença em relação ao controle (Teste de Duncan). ptn = proteína.

e não sofreu alteração na presença do ácido fenilacético [F(3,20)=0,39; p>0,05, n=6]. A figura 11 mostra que o ácido fenilpirúvico [F(3,24)=2,70; p>0,05, n=7], ácido feniláctico [F(3,20)=2,09; p>0,05, n=6] e o ácido fenilacético [F(3,20)=2,44; p>0,05; n=6] não alteraram o TAR. Esses resultados indicam que os ácidos fenilpirúvico e feniláctico alteram a capacidade antioxidante total do tecido por alterar suas defesas antioxidantes, analisada através da medida do TRAP.



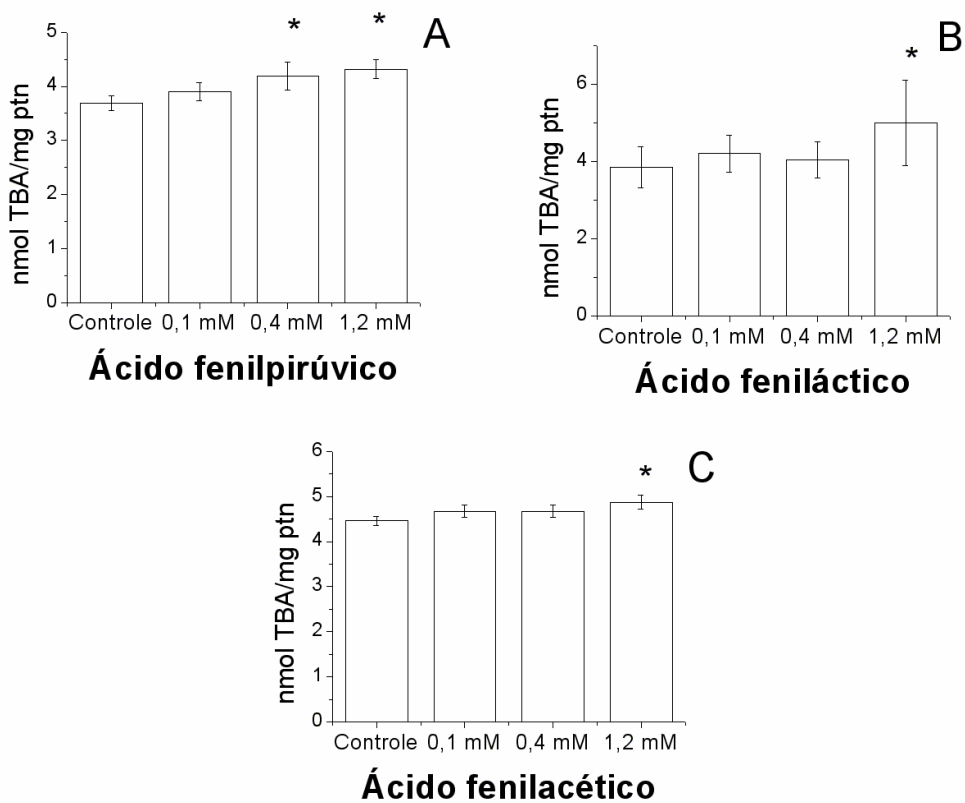


Figura 9: Efeito *in vitro* do Ácido fenilpirúvico (A), Ácido feniláctico (B) e Ácido fenilacético (C) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em cérebro de ratos jovens. Resultados expressos em média  $\pm$  DP [n=4 (A,C), n=6(B)]. \*p<0,05, diferença em relação ao controle (Teste de Duncan). Ptn = proteína.

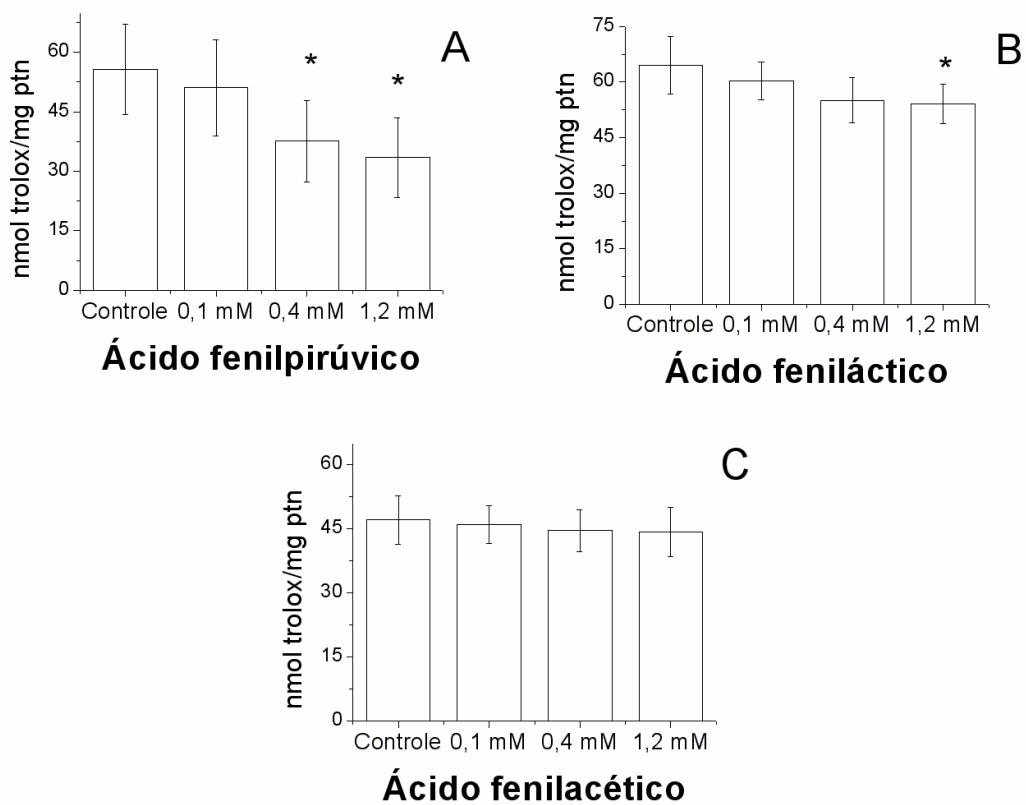


Figura 10: Efeito *in vitro* do Ácido fenilpirúvico (A), Ácido feniláctico (B) e Ácido fenilacético (C) sobre o potencial antioxidante total (TRAP) em cérebro de ratos jovens. Resultados expressos em média  $\pm$  DP [n=7 (A), n=6 (B,C)]. \*p<0,05, diferença em relação ao controle (Teste de Duncan). ptn= proteína.

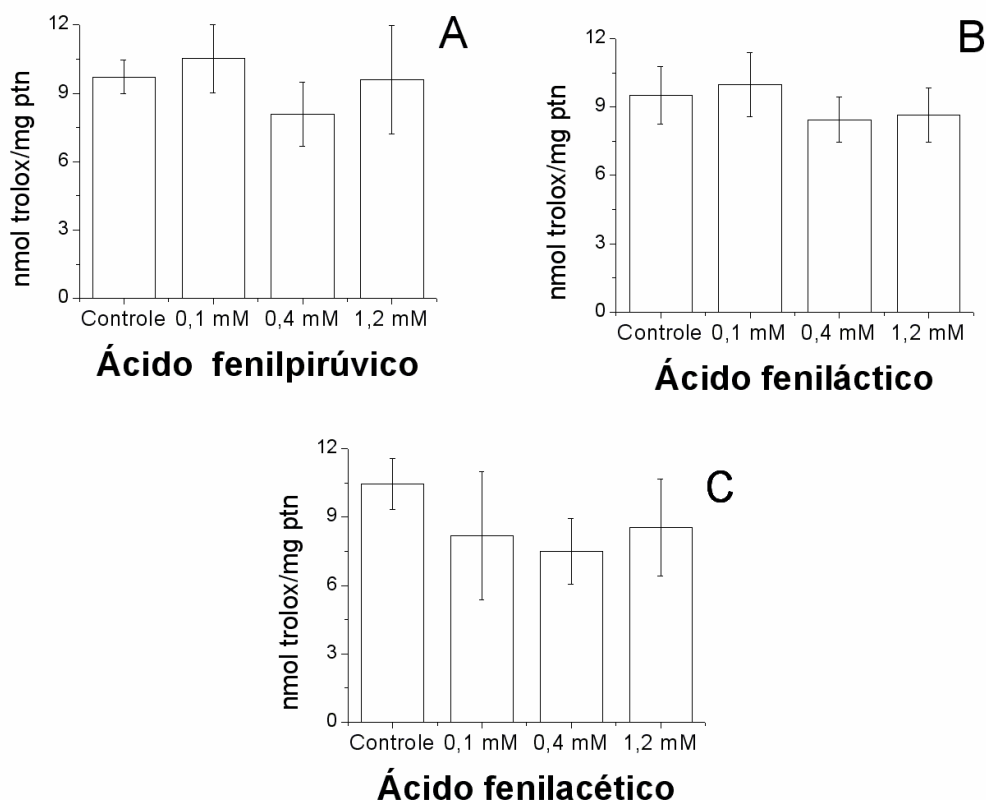


Figura 11: Efeito *in vitro* do Ácido fenilpirúvico (A), Ácido feniláctico (B) e Ácido fenilacético (C) sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em cérebro de ratos jovens. Resultados expressos em média  $\pm$  DP [n=7 (A), n=6 (B,C)]. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA). ptn= proteína.

Investigamos também o conteúdo de tióis totais no homogeneizado de cérebro de ratos jovens. A figura 12 mostra que os metabólitos da fenilalanina, ácido fenilpirúvico [F(3,12)=0,32;  $p>0,05$ , n=4], ácido feniláctico [F(3,20)=2,65;  $p>0,05$ , n=6] e o ácido fenilacético [F(3,16)=0,82;  $p>0,05$ , n=5] não alteram este parâmetro. Já na figura 13, observamos que 0,4 mM e 1,2 mM do ácido fenilpirúvico alteram o conteúdo de grupos carbonila do tecido [F(3,20)=125,35;  $p<0,001$ , n=6], de maneira dose-dependente [beta=0,92;  $p<0,001$ ], o que sugere que este ácido acarreta um

dano oxidativo às proteínas da amostra. Na figura 13 também se observa que os ácidos fenilático [F(3,24)=1,16;  $p>0,05$ ,  $n=7$ ] e fenilacético [F(3,24)=1,88;  $p>0,05$ ,  $n=7$ ] não alteraram o conteúdo de grupos carbonila em homogeneizado.

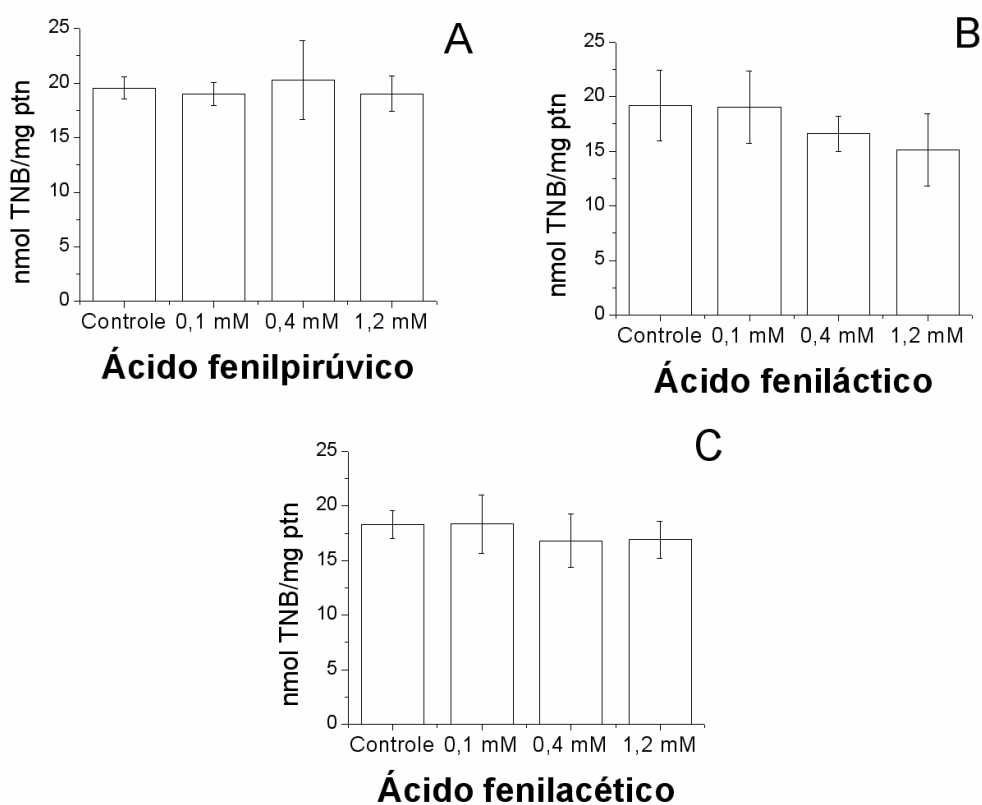


Figura 12: Efeito *in vitro* do Ácido fenilpirúvico (A), Ácido fenilático (B) e Ácido fenilacético (C) sobre a medida de tióis totais em cérebro de ratos jovens. Resultados expressos em média  $\pm$  DP [ $n=4$  (A),  $n=6$  (B),  $n=5$  (C)]. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA). ptn= proteína.

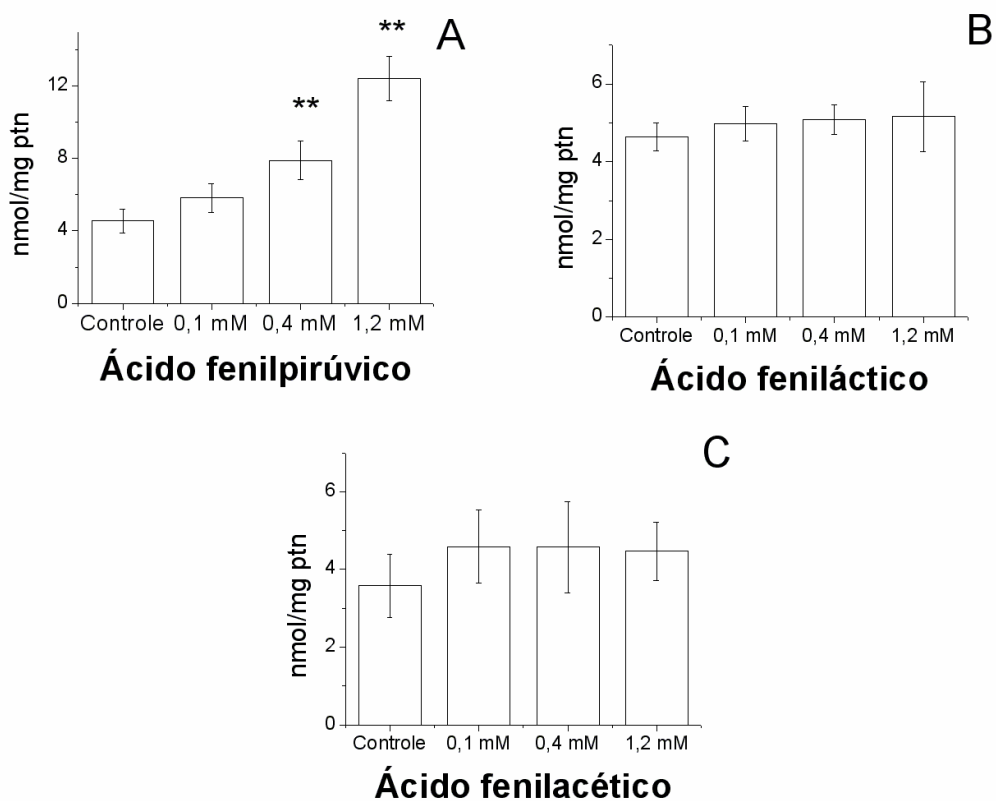


Figura 13: Efeito *in vitro* do Ácido fenilpirúvico (A), Ácido feniláctico (B) e Ácido fenilacético (C) sobre o conteúdo de grupos carbonilas em cérebro de ratos jovens. Resultados expressos em média  $\pm$  DP [n=6 (A), n=7 (B,C)]. \*\*p<0,01, diferenças em relação ao controle (Teste de Duncan). ptn= proteína.

Na figura 14 pode-se observar a medida do conteúdo de GSH presente na amostra. O ácido fenilpirúvico reduziu este parâmetro significativamente na concentração de 1,2 mM [F(3,16)=4,36; p<0,05, n=5], assim como 0,4 e 1,2 mM do ácido feniláctico [F(3,12)=22,14; p<0,01, n=4], o qual demonstrou efeito de dose-dependência [beta=-0,78; p<0,001], enquanto que o ácido fenilacético não alterou o conteúdo de GSH da amostra [F(3,12)=2,85; p>0,05, n=4]. Estes resultados indicam que os ácidos fenilpirúvico e feniláctico reduzem a quantidade de GSH presente na

amostra, indicando que os mesmos interferem em um importante antioxidante do tecido.

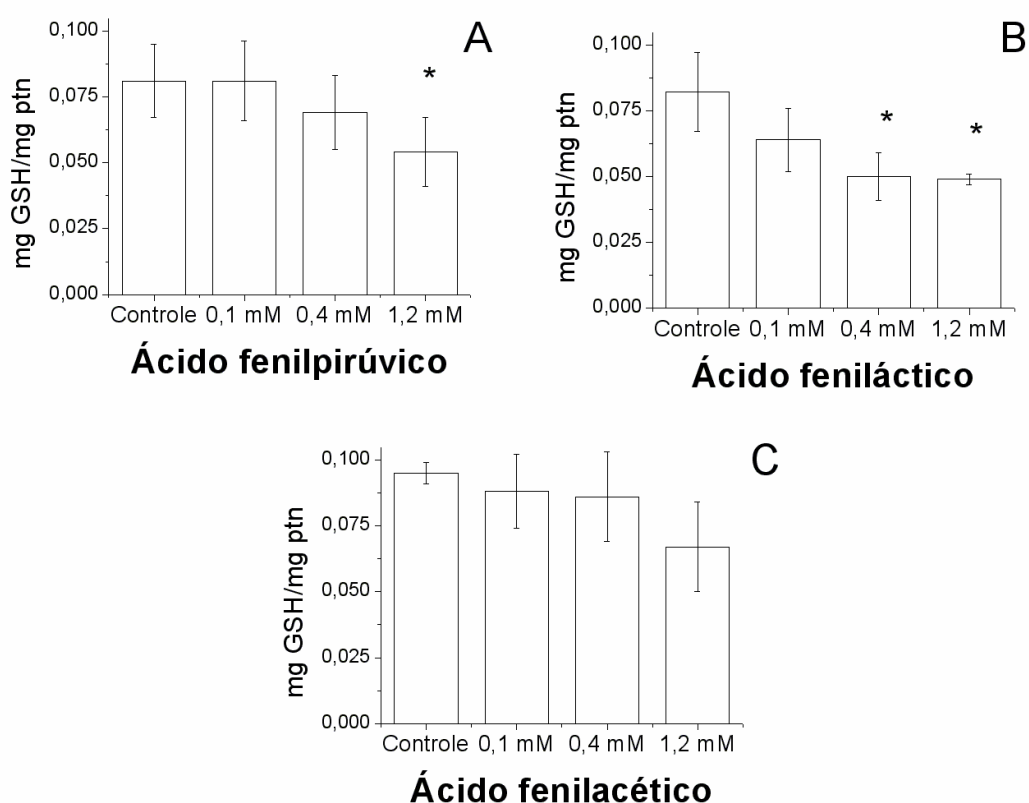


Figura 14: Efeito *in vitro* do Ácido fenilpirúvico (A), Ácido feniláctico (B) e Ácido fenilacético (C) sobre o conteúdo de GSH em cérebro de ratos jovens. Resultados expressos em média  $\pm$  DP [n=5 (A), n=4 (B,C)]. \*  $p < 0,05$ , diferenças em relação ao controle (Teste de Duncan). ptn= proteína.

Após analisamos o conteúdo de 2', 7' diclorofluoresceína (DCF), o qual é um meio de estimar a formação de espécies reativas de oxigênio. A figura 15 mostra que os ácidos fenilpirúvico [ $F(3,28)=0,47$ ;  $p > 0,05$ ,  $n=8$ ] e feniláctico [ $F(3,12)=1,72$ ;  $p > 0,05$ ,  $n=4$ ] não alteram esta dosagem, enquanto que o 1,2 mM do ácido fenilacético aumenta o conteúdo de DCF [ $F(3,24)=3,69$ ;  $p < 0,05$ ,  $n=7$ ]. Este resultado

indica que o ácido fenilacético aumenta o conteúdo de DCF em homogeneizado de cérebro total de ratos jovens, demonstrando que este ácido induz um aumento nas espécies reativas de oxigênio.

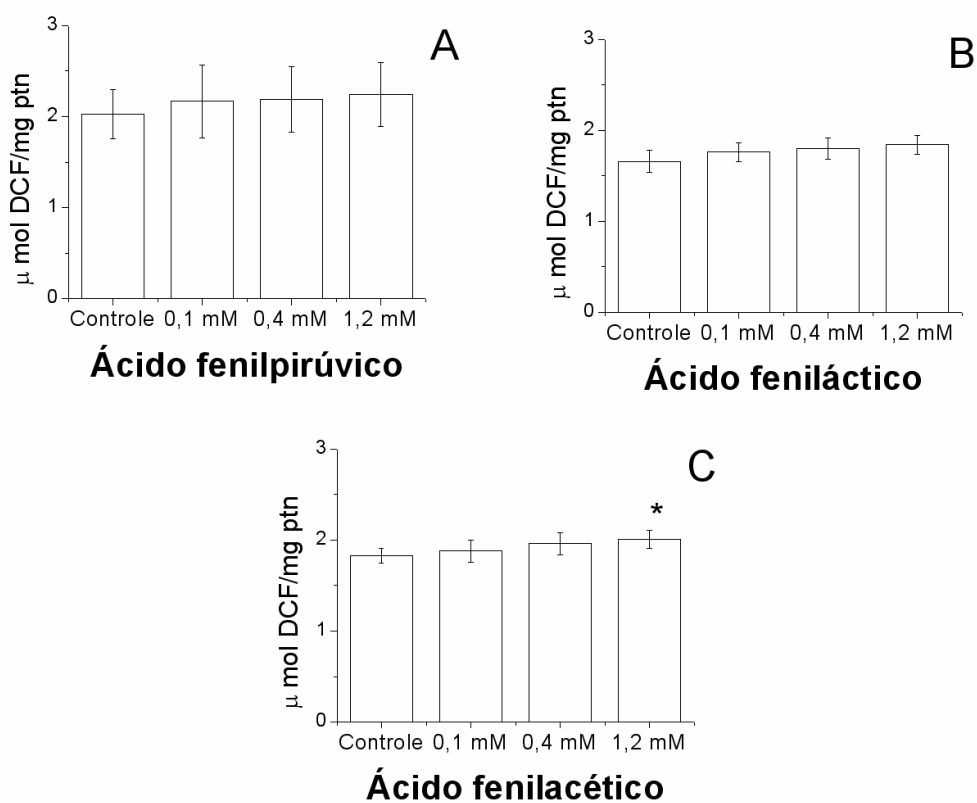


Figura 15: Efeito *in vitro* do Ácido fenilpirúvico (A), Ácido feniláctico (B) e Ácido fenilacético (C) sobre o conteúdo de 2',7' diclorofluoresceína (DCF) em cérebro de ratos jovens. Resultados expressos em média  $\pm$  DP [n=8 (A), n=4 (B), n=7 (C)]. \* $p < 0,05$ , diferença em relação ao controle (Teste de Duncan). ptn= proteína.

Finalmente, a atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GSH-Px foi medida na presença de 0,1, 0,4 e 1,2 mM de ácido fenilpirúvico, ácido fenilático e ácido fenilacético. Todos os ácidos testados reduziram a atividade da enzima catalase em homogeneizado de cérebro de ratos (figura 16): ácido fenilpirúvico [F(3,12)=10,83;  $p < 0,01$ ,  $n=4$ ], ácido fenilático [F(3,12)=11,56;  $p < 0,01$ ,  $n=4$ ] e ácido fenilacético [F(3,12)=17,49;  $p < 0,01$ ,  $n=4$ ]. A figura 17 mostra a atividade da enzima superóxido dismutase, a qual não foi alterada pelos ácidos fenilpirúvico [F(3,28)=0,17;  $p > 0,05$ ,  $n=8$ ], fenilático [F(3,28)=1,12;  $p > 0,05$ ,  $n=8$ ] e fenilacético [F(3,28)=1,47;  $p > 0,05$ ,  $n=8$ ]. Assim como a atividade da CAT, todos os ácidos testados reduziram a atividade da glutathione peroxidase (figura 18), sendo esta redução dose-dependente: ácido fenilpirúvico [F(3,28)=49,46;  $p < 0,01$ ,  $n=8$ ] [beta=-0,78;  $p < 0,001$ ], ácido fenilático [F(3,28)=32,84;  $p < 0,01$ ,  $n=8$ ] [beta=-0,72;  $p < 0,001$ ] e ácido fenilacético [F(3,24)=41,02;  $p < 0,01$ ,  $n=8$ ] [beta=-0,78;  $p < 0,001$ ]. Estes resultados indicam que estes metabólitos podem afetar diretamente a atividade das enzimas antioxidantes CAT e GSH-Px, enquanto que não afetam diretamente a atividade da SOD.



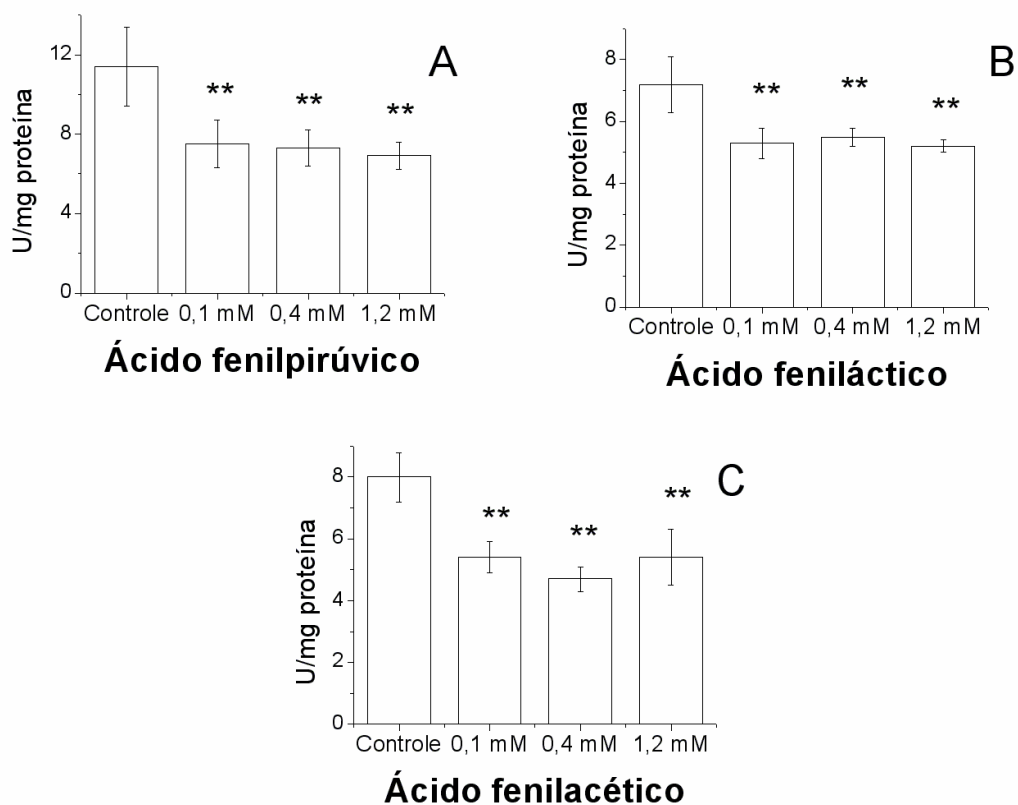


Figura 16: Efeito *in vitro* do Ácido fenilpirúvico (A), Ácido feniláctico (B) e Ácido fenilacético (C) sobre a atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) em cérebro de ratos jovens. Resultados expressos em média  $\pm$ DP [n=4 (A), n=8 (B, C)]. \*\*p<0,01, diferença em relação ao controle (Teste de Duncan).

Uma unidade de CAT é definida como um  $\mu$ mol de  $H_2O_2$  consumido por minuto.

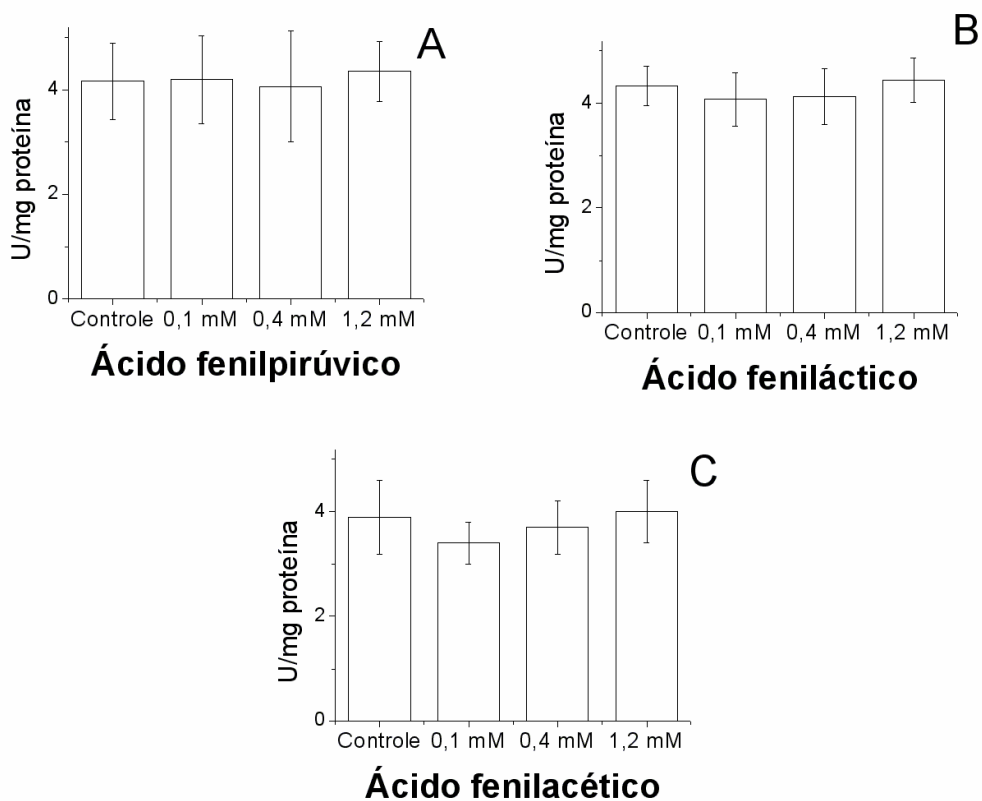


Figura 17: Efeito *in vitro* do Ácido fenilpirúvico (A), Ácido feniláctico (B) e Ácido fenilacético (C) sobre a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) em cérebro de ratos jovens. Resultados expressos em média  $\pm$  DP [n=4 (A), n=8 (B, C)]. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA). Uma unidade de SOD é definida como 50 % de inibição da auto-oxidação do pirogalol.

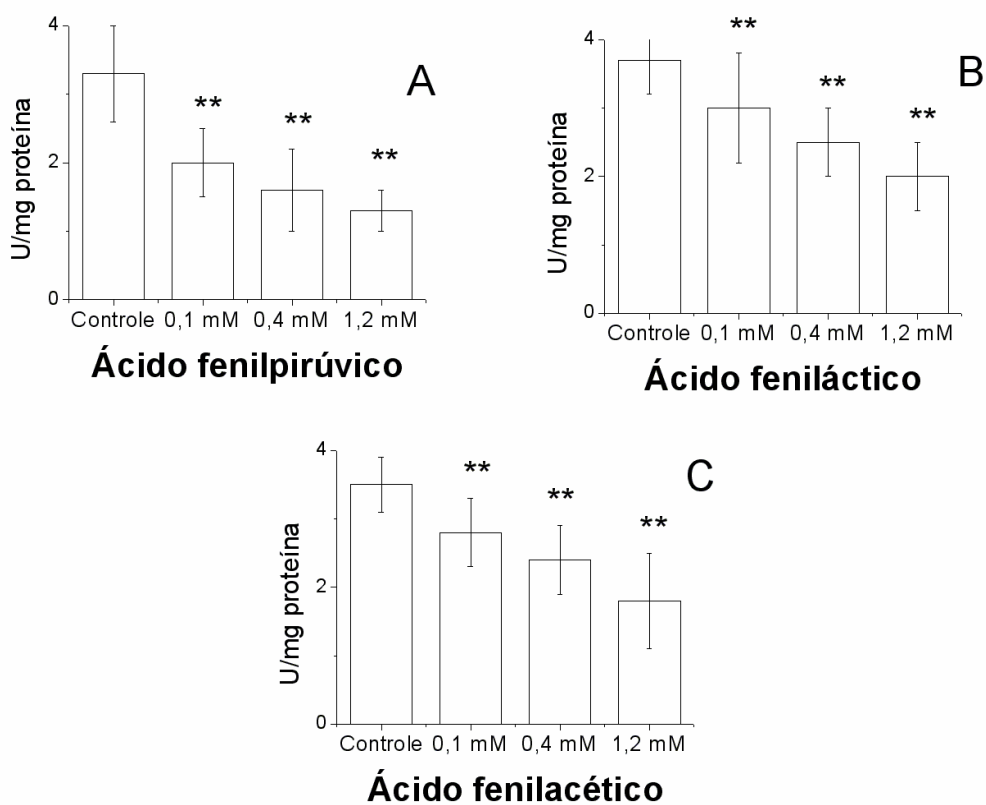


Figura 18: Efeito *in vitro* do Ácido fenilpirúvico (A), Ácido feniláctico (B) e Ácido fenilacético (C) sobre a atividade da enzima antioxidante glutatona peroxidase (GSH-Px) em cérebro de ratos jovens. Resultados expressos em média  $\pm$  DP [n=4 (A), n=8 (B, C)]. \*\*p<0,01, diferença em relação ao controle (Teste de Duncan). Uma unidade de GSH-Px é definida como um  $\mu$ mol de NADPH consumido por minuto.

## V. DISCUSSÃO

A PKU é um erro inato do metabolismo caracterizado bioquimicamente pela deficiência severa da atividade da enzima PHA, o que promove o bloqueio da hidroxilação da fenilalanina à tirosina no primeiro passo de seu catabolismo (Figura 1) (Scriver e Kaufman, 2001). Sendo assim, ocorre um aumento nos níveis desse aminoácido (podendo alcançar níveis séricos de 1 a 3 mM) e de seus metabólitos, ácido fenilpirúvico, ácido fenilático e ácido fenilacético nos tecidos dos pacientes (Scriver e Kaufman, 2001). Esses metabólitos são compostos normais, mas que estão presentes em quantidades anormais nos pacientes fenilcetonúricos (Knox, 1972; Nyhan, 1984). Pacientes com PKU apresentam inúmeros sintomas em maior ou menor intensidade, sendo que, dentre as manifestações neuropsiquiátricas (característica nos pacientes fenilcetonúricos), a mais importante é o retardo mental (Nyhan, 1984). Atualmente, o diagnóstico da PKU é amplamente realizado através da triagem neonatal (Kohli et al., 2005; Clague e Thomas, 2002). Isto assume grande importância no manejo da doença, já que o dano neurológico, que pode ser prevenido pela terapia, se instalado é irreversível (Scriver e Kaufman, 2001; Kohli et al., 2005).

Mais de cinquenta anos após a publicação do primeiro tratamento proposto para PKU, ainda não foi descoberto o tratamento ideal para melhorar a qualidade de vida destes pacientes, apesar dos muitos avanços já alcançados. Bickel e colaboradores (1954) desenvolveram um tratamento dietético, com restrição de fenilalanina, após a insistência da mãe de uma menina com fenilcetonúria

diagnosticada por eles. A menina tinha dois anos de idade, era gravemente retardada e apresentava outros sintomas clínicos. Em poucos meses, após alguns testes, os pesquisadores concluíram que o tratamento dietético estava trazendo os resultados esperados, pois a menina apresentou um desenvolvimento cerebral significativo e obteve alta hospitalar.

Depois deste estudo, vários pesquisadores continuaram investigando os aspectos da doença a fim de aperfeiçoar o tratamento e entender melhor a sua fisiopatologia.

As elevações dos níveis sanguíneos de fenilalanina estão associadas ao agravamento da disfunção neuropsiquiátrica. Vários pesquisadores já demonstraram que uma dieta restrita em fenilalanina previne a instalação dos sintomas neurológicos quando iniciada logo após o nascimento, indicando que não é a deficiência da enzima fenilalanina hidroxilase, mas a hiperfenilalaninemia e/ou o acúmulo dos metabólitos da fenilalanina (fenilpiruvato, fenilactato e fenilacetato), que causam os danos cerebrais. Embora os pacientes fenilcetonúricos apresentem um padrão característico de disfunção neuropsiquiátrica, os mecanismos patogênicos responsáveis por estas alterações não estão bem definidas.

O envolvimento dos radicais livres e do estresse oxidativo na fisiopatologia de várias situações que comprometem o sistema nervoso central tem sido cada vez mais estudado. Um dos aspectos freqüentemente abordados são as mudanças patológicas que determinam à morte neuronal secundária, ou seja, de neurônios não afetados diretamente pelo insulto primário, mas sim por uma cascata de eventos provocada por esse. Um dos primeiros fenômenos observados nesta seqüência de

eventos é o processo de lipoperoxidação induzida por radicais livres de oxigênio (Carney, Tatsuno e Floyd, 1992).

Através de análises *in vitro* (Hagen et al., 2002), em modelo animal (Ercal et al., 2002; Martinez-Cruz et al., 2002) e em pacientes (Wilke et al., 1992; Sierra et al., 1998; van Backel et al., 2000; Colomé et al., 2003; Artuch et al., 2004; Sirtori et al., 2005; Sitta et al., 2006), diversos estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo parece estar envolvido na fisiopatologia da fenilcetonúria.

Já que o mecanismo bioquímico da disfunção cerebral na PKU não está ainda totalmente esclarecido, o presente trabalho consistiu no estudo *in vitro* da capacidade dos metabólitos da fenilalanina (ácido fenilpirúvico, ácido fenilático e ácido fenilacético) em contribuir com o estresse oxidativo presente na PKU. Cabe salientar que a concentração cerebral destes metabólitos está correlacionada positivamente com níveis plasmáticos de fenilalanina (Sarkissian, Scriver e Mamer, 2000) e que alguns efeitos observados *in vivo* não foram devidos à fenilalanina.

Inicialmente, o estresse oxidativo foi avaliado pela análise de dois índices de lipoperoxidação, a quimiluminescência e a medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de cérebro de ratos jovens. Observou-se que houve um aumento significativo da quimiluminescência na presença dos ácidos fenilpirúvico (de maneira dose-dependente) e fenilático, e o TBA-RS foi alterado pela presença de todos os metabólitos testados, sendo que novamente o ácido fenilpirúvico mostrou um efeito dose-dependente. Considerando que a quimiluminescência é um processo no qual ocorre a emissão de luz visível quando espécies excitadas (oxigênio “singlet” e carbonilas excitadas) geradas durante a

lipoperoxidação retornam ao seu estado fundamental (Halliwell e Gutteridge, 2001), e o TBA-RS reflete a quantidade de malondialdeído formado na degradação de lipídios promovida pela lipoperoxidação (Esterbauer e Cheeseman, 1990), esses resultados sugerem que não apenas a fenilalanina (Hagen et al., 2002), mas também seus metabólitos induzem a lipoperoxidação em cérebro de ratos jovens por aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio. Esta indução na lipoperoxidação na PKU está de acordo com publicações anteriores (Wilke et al., 1992; Ercal et al., 2002; Colome et al., 2003; Sirtori et al., 2005; Sitta et al., 2006).

A etapa seguinte foi estudar o efeito dos metabólitos sobre as defesas antioxidantes não-enzimáticas cerebrais através da determinação do potencial antioxidante total (TRAP) e da reatividade antioxidante total (TAR). O TRAP é uma medida de defesas antioxidantes não-enzimáticas. Já o TAR, reflete a capacidade de um certo tecido modular o dano associado a uma produção aumentada de radicais livres, sendo uma medida que representa a reatividade antioxidante do tecido em estudo (Lissi et al., 1995). Foi possível observar no presente trabalho uma redução significativa e de forma dose-dependente do TRAP na presença do ácido fenilpirúvico e uma pequena redução na presença do ácido fenilático. Já o TAR não foi alterado por nenhum dos metabólitos testados. Assim, esses resultados mostram que os ácidos fenilpirúvico e fenilático reduzem a quantidade dos antioxidantes não-enzimáticos, indicando que os mesmos podem prejudicar estas defesas, sem, no entanto, alterar sua reatividade. Hagen e colaboradores (2002) já haviam demonstrado uma redução do potencial antioxidante total (TRAP) *in vitro* em cérebro de ratos jovens na presença de fenilalanina, porém também demonstraram em

modelo animal de PKU esta mesma redução; juntando aos nossos resultados, percebemos que a fenilalanina e os ácidos fenilpirúvico e fenilático são responsáveis pela redução nas defesas antioxidantes não-enzimáticas do tecido cerebral de ratos.

A exposição de proteínas a radicais livres de oxigênio pode causar mudanças extremas, levando a modificações nas suas estruturas. Consequentemente, suas funções podem ser modificadas, a suscetibilidade a fragmentação induzida ou espontânea pode ser aumentada, e as reações imunológicas podem ser alteradas (Faure e Lafond, 1995). Investigamos, então, o conteúdo de tióis totais e a medida do conteúdo de grupos carbonila no homogeneizado de cérebro de ratos jovens como possíveis indicadores de dano oxidativo a proteínas. Apesar de os metabólitos não alterarem o conteúdo de grupos SH do tecido, o ácido fenilpirúvico aumentou marcadamente o conteúdo de grupos carbonila e de maneira dose-dependente. Tendo em vista que, entre vários marcadores de modificação em aminoácidos nas proteínas, a formação de grupos carbonila pode ser um marcador precoce da oxidação (Reznick e Packer, 1994), esse resultado sugere que o ácido fenilpirúvico acarreta um forte dano oxidativo às proteínas.

Investigamos também o conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) do tecido. A GSH tem um importante papel na prevenção da injúria mediada por radicais, atuando como um *scavenger* e na reação catalisada pela enzima antioxidante GSH-Px. Em conjunto com a SOD, que converte ânion superóxido em  $H_2O_2$ , a GSH-Px converte  $H_2O_2$  em água e como resultado GSH é oxidado a dissulfeto de glutathiona (GSSG). Nesta reação, a GSH atua como um cofator na remoção de radicais do



organismo. Durante o estresse oxidativo, os níveis de GSH declinam e os de GSSG aumentam (Browne e Armstrong, 1998). O presente estudo mostra que os ácidos fenilpirúvico e fenilático diminuíram os níveis de GSH *in vitro* comparado ao grupo controle. van Backel e colaboradores (2000) demonstraram uma redução nos níveis de GSH em eritrócitos de pacientes fenilcetonúricos sob tratamento com dieta restrita em fenilalanina. Uma diminuição nos níveis de GSH pode ser devido a uma inibição criada pelos altos níveis de fenilalanina no sistema de transporte dos aminoácidos glicina e cisteína no ciclo  $\gamma$ -glutamil, o qual sintetiza continuamente GSH, ou devido a um aumento na formação de radicais livres (Ercal et al., 2002). Quando GSH está diminuída, as células ficam com baixo poder antioxidante e mais propensas ao dano oxidativo causado por espécies reativas. Isto é especialmente verdadeiro para células mais vulneráveis ao ataque oxidativo, assim como os eritrócitos e as células cerebrais (Bains e Shaw, 1997; Ercal et al., 2002). Uma diminuição nos níveis de GSH também pode aumentar os níveis de moléculas excitotóxicas e, assim como o dano oxidativo, estas moléculas podem iniciar eventos que culminam com morte celular por apoptose em certas regiões cerebrais (Bains e Shaw, 1997).

2',7'-Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) tem sido utilizada para estimar a formação de espécies reativas ou o metabolismo oxidativo em neutrófilos e leucócitos polimorfonucleares (Oyama et al., 1994). O DCF é formado dentro das células a partir da oxidação do DCFH por espécies reativas intracelulares. A medida da fluorescência do DCF neste estudo foi aumentada pelo ácido fenilacético, o que sugere que na presença deste metabólito há um aumento na formação de espécies

reativas. Já os ácidos fenilpirúvico e fenilático não alteram os níveis das espécies reativas sensíveis a esta medida, sugerindo que estas não estão envolvidas no mecanismo de toxicidade acarretado por estes metabólitos.

Finalmente, foram também determinadas as atividades das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GSH-Px. A CAT dismuta o peróxido de hidrogênio; a SOD catalisa a dismutação do radical superóxido; e a GSH-Px catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos com a glutathiona reduzida (Marklund, 1985). Diferentemente dos experimentos anteriores, nos quais o homogeneizado era incubado na presença dos metabólitos por 1 hora a 37°C antes das determinações, nessa etapa os ácidos foram adicionados ao homogeneizado apenas no momento da medida das atividades enzimáticas, ou seja, sem incubação prévia, com o objetivo de medir o efeito direto dos ácidos testados sobre a atividade da enzima.

A atividade da enzima SOD não foi alterada por nenhum dos metabólitos da fenilalanina, o que está de acordo com estudos prévios realizados em eritrócitos de pacientes com PKU (Sierra et al., 1998; van Backel et al., 2000; Artuch et al, 2004; Sirtori et al, 2005). A atividade da catalase foi diminuída na presença dos três ácidos testados. Estudos prévios com a enzima catalase têm resultados bastante distintos, enquanto nosso resultado está de acordo com estudos anteriores de nosso grupo em modelo animal (Hagen et al., 2002), e com o estudo de Artuch e colaboradores (2004), onde foi demonstrada uma redução significativa da atividade da CAT em eritrócitos de pacientes com PKU em comparação ao grupo controle, Sierra e colaboradores (1998) e Sirtori e colaboradores (2005) não encontraram diferenças entre grupo controle e PKU na atividade desta enzima. Já Ercal e colaboradores

(2002) demonstraram que em modelo animal *knockout* de PKU há um aumento da atividade da CAT. A inibição da atividade da CAT pelos metabólitos da fenilalanina pode ser devida a uma interação direta dos ácidos com a enzima, já que produziram uma rápida e potente inibição da CAT *in vitro*.

A GSH-Px também apresentou uma redução na sua atividade, de maneira dose-dependente, na presença dos metabólitos da fenilalanina, ácidos fenilpirúvico, fenilático e fenilacético. Artuch e colaboradores (2004) não encontraram diminuição na atividade da GSH-Px, mas sugerem que esta diferença não foi observada devido à suplementação com selênio na dieta dos pacientes utilizados no estudo. No entanto, segundo Sirtori e colaboradores (2005), que também observaram uma redução atividade da enzima GSH-Px, esta redução não pode ser relacionada com uma deficiência de selênio, o qual é essencial à atividade da enzima, já que os pacientes utilizados na investigação não estavam sob dieta restrita em proteínas ou fenilalanina. Outros estudos também descreveram uma diminuição da atividade da GSH-Px plasmática e do conteúdo de selênio em pacientes hiperfenilalaninêmicos (Wilke et al., 1992; Sierra et al., 1998), o que sugere a participação do estresse oxidativo na fenilcetonúria. No entanto, Wilke e colaboradores (1992) declararam que não foram observados sintomas clínicos em pacientes com PKU que pudessem ser diretamente atribuídos à deficiência de selênio. De fato, foi observada baixa atividade da GSH-Px eritrocitária em muitos pacientes com uma dieta livre ou sob tratamento com suplemento de selênio (ambos os grupos com níveis normais de selênio), sugerindo uma falta de correlação entre níveis plasmáticos de selênio e atividade da GSH-Px (Sierra et al., 1998). Nestes pacientes, os distúrbios

neurológicos foram observados mais frequentemente do que naqueles com atividade normal da GSH-Px.

Os diferentes resultados encontrados em eritrócitos de fenilcetonúricos devem-se provavelmente a diferenças na dieta e no estado clínico dos pacientes utilizados nos estudos. Todos estes dados chamam a atenção à necessidade de um bom controle metabólico nos níveis plasmáticos de fenilalanina, como recomendado (Scriver e Kaufman, 2001).

O estresse oxidativo tem sido mostrado em modelos animais de PKU. Foi observado que a hiperfenilalaninemia provoca estresse oxidativo em cérebro de ratos (Hagen et al., 2002) e também que a lipoperoxidação foi significativamente aumentada no cérebro, assim como a taxa GSH/GSSG foi diminuída e a atividade das enzimas catalase e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) foi aumentada em eritrócitos em um modelo animal *knockout* de PKU (Ercal et al., 2002). Além disso, Martinez-Cruz e colaboradores (2002) demonstraram alterações de parâmetros de estresse oxidativo em cérebro e cerebelo de filhotes de ratos hiperfenilalaninêmicos e que melatonina e outros antioxidantes foram capazes de prevenir este dano oxidativo.

O estresse oxidativo observado na PKU pode ser devido a muitas causas. Primeiro, pode ser devido a uma diminuição no consumo de antioxidantes ou uma deficiência no metabolismo antioxidante. Uma diminuição de selênio foi demonstrada, e devido a isto houve também uma redução na atividade da GSH-Px, já que o selênio é cofator desta enzima. Já que a GSH-Px remove peróxidos, estes acumulariam se essa atividade fosse insuficiente. Segundo, os produtos dos

caminhos alternativos de metabolização da fenilalanina podem induzir a formação de radicais livres. Já foram observados, por Swaiman e Wu (1984), efeitos tóxicos do fenilacetato em cultura de neurônios corticais. Além disso, a administração de fenilpiruvato é capaz de induzir necrose cerebral acompanhada de disfunção neurocomportamental em camundongos recém-nascidos (Gazit et al., 2003). Nos resultados aqui descritos, observamos, através de alguns parâmetros, que os ácidos fenilpirúvico, feniláctico e fenilacético induzem a formação de espécies reativas. Terceiro, a fenilalanina é substrato da enzima tirosina hidroxilase (Scriver e Kaufman, 2001) e, já que na PKU os níveis de fenilalanina estão extremamente altos e os de tirosina estão baixos, a tirosina hidroxilase atua menos discriminativamente sobre a fenilalanina, produzindo di-hidróxi-fenilalaninas. A oxidação destas catecolaminas pode produzir superóxido e peróxido de hidrogênio em uma série de reações (Halliwell e Gutteridge, 1999). Finalmente, o estresse oxidativo pode ser devido a altas concentrações de fenilalanina, as quais inibem o sistema de transporte de aminoácidos e, portanto, os aminoácidos envolvidos na síntese de moléculas e enzimas antioxidantes podem não atuar eficientemente.

Sabe-se que na PKU os níveis de fenilalanina estão extremamente altos e os de tirosina estão baixos, porém os níveis de tirosina não influenciam o desenvolvimento normal dos pacientes (Scriver e Kaufman, 2001; Cabalska et al., 2000). Sendo assim, parece que não apenas a fenilalanina, mas, como pudemos observar neste trabalho, também o acúmulo de seus metabólitos (ácido fenilpirúvico, ácido feniláctico e ácido fenilacético) colabora para o estresse oxidativo presente na PKU.

Apesar de a PKU ser estudada já há muitos anos, o dano cerebral presente ainda não é completamente entendido. Quando uma dieta restrita é iniciada cedo, o retardo mental é prevenido. Nossos resultados sugerem a importância do estudo de uma suplementação antioxidante na dieta dos pacientes, a fim de prevenir possíveis danos causados por radicais livres.

## VI. CONCLUSÕES

Os ácidos fenilpirúvico, fenilático e fenilacético alteraram, *in vitro*, vários dos parâmetros de estresse oxidativo estudados em cérebro de ratos jovens, indicando assim, que os metabólitos da fenilalanina podem estar envolvidos no estresse oxidativo observado na fenilcetonúria.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121-126.
- Agostini C., Harvie A., MacCulloch D.L., Demellweek C., Cockburn 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.
- 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.
- Bains J.S. and Shaw C.A. (1997) Neurodegenerative disorders in human: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal cell death. *Brain Res. Rev.* 25, 335-358.
- 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



- 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.
- Bickel H., Gerrard J. and Hickman E.M. (1954) The influence of phenylalanine intake on the chemistry and behavior of a phenylketonuric child. *Acta. Pediatr.* 43, 64-77.
- Boveris A. (1998) Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina (Buenos Aires)* 58, 350-356.
- Browne W.B. and Armstrong D. (1998) Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Meth. Molec. Biol.* 108, 347-352.
- Cabalska B., Nowacka M., Laskowska-Klita T., Nowaczewska I., Zorska K. and Taljanski W. (2000) Serum tyrosine in children with phenylketonuria and mild hyperphenylalaninemia. *Med. Wieku Rozwoj.* 4, 5-12.
- Carney J.M., Tatsuno R.A. and Floyd R.A. (1992) The role of oxygen radicals in ischemic brain damage: free radicals production, protein oxidation and tissue dysfunction. In Kreiglstein H. and Oberpichler-Schwenk H. *Pharmacology of Cerebral Ischemia: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart*, 321-331.

- 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.
- Clague A. and Thomas A. (2002) Neonatal biochemical screening for disease. *Clin. Chim. Acta.* 315, 99-110.
- 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., 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.
- Ercal N., Aykin-Burns N., Gurer-Orhan and McDonald J.D. (2002) Oxidative stress in a phenylketonuria animal model. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 906-911.
- Esterbauer H. and Cheeseman K.H. (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 186, 407-421.

- 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.
- Faure P. and Lafond J.-L. (1995) Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In Fosier A.E., Cadet J., kalyanararnan B., Fonierave M. Ad Pierre J.-L. (editores) *Analysis of Free radicals in Biological systems*. Birkhäuser Verlag. Basel·Bosto·Belin.
- Feksa L.R., Cornelio A.R., Rech V.C., Dutra-Filho C.S., Wyse A.T.S., Wajner M. and Wannmacher C.M. (2002) Alanine prevents the reduction of pyruvate kinase activity in brain cortex of rats subjected to chemically induced hyperphenylalaninemia. *Neurochem. Res.* 27, 947-952.
- 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.
- Fois A., Rosemberg C. and Gibb F.A. (1955) The electroencephalogram in phenylpyruvic oligophrenia. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 7, 568-569.
- Fridovich I. (1975) Superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.* 44, 147-157.
- Gámez 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.
- Gazit V., Ben-Abraham R., Pick C.G. and Katz Y. (2003) beta-Phenylpyruvate induces long-term neurobehavioral damage and brain necrosis in neonatal mice. *Behav. Brain Res.* 143, 1-5.

- Glushakov A.V., Dennis D.M., Sumners C., Seubert C.N. and Martynyuk A.E. (2003) L-phenylalanine selectively depresses currents at glutamatergic excitatory synapses. *J. Neurosci. Res.* 72, 116-124.
- Greengard O., Yoss M.S. and Delvalle J.A. (1976)  $\alpha$ -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 M.E.K., Pederzolli 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. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3<sup>o</sup> edição. New York: Oxford University Press.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. (2001) Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death. In Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. (editores) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4<sup>a</sup> 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.
- 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.

- Hommel 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.
- Koch R., Moats R., Guttler F., Guldberg P. and Nelson-Jr M. (2000) Blood-brain phenylalanine relationships in person with phenylketonuria. *Pediatrics.* 106, 1093-1096.
- Kohli S., Saxena R., Thomas E., Rao P. and Verma I.C. (2005) Prenatal diagnosis of phenylketonuria. *Indian. J. Med. Res.* 122, 400-403.
- Lissi E., Caceres T. and Videla L.A. (1986) Visible chemiluminescence from rat homogenates undergoing autoxidation. I. Effect of additives and products accumulation. *J. Free. Radic. Biol. Med.* 2, 63-69.
- Lissi E., Pascual C. and Del castilho M. D. (1992) Luminol luminescence induced by 2,2' -azo-bis(2-amidinopropano) thermolysis. *Free Rad. Res. Comms.* 17, 299-311.
- Lissi E., Salim-Hanna M., Pascual C. and Del Castillo M.D. (1995) Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-

- enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 153-158.
- 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 hyperphenylalninemic 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.
- Marklund S.L. (1985) Pyrogallol autoxidation. In Greenwald R.A. (editor) *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton, CRC Press.
- 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.
- Martynyuk A.E., Glushakov A.V., Sumners C., Laipis P.J., Dennis D.M. and Seubert C.N. (2005) Impaired glutamatergic synaptic transmission in the brain. *Molec. Genet. Metab.* 86, S34-S42.
- McCord J.M. and Fridovich I. (1969) Superoxido dismutase: an enzymic function for eruthrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.

- Moats R.A., Koch R., Moseley K., Guldberg P., Guttler F., Boles R.G. and Nelson-Jr M.D. (2000) Brain phenylalanine concentration in the management of adults with phenylketonuria. *J. Inher. Metabolic Dis.* 23, 7-14.
- Moyano D., Vilaseca M.A., Pineda M., Campistol J., Vernet A., Póo P., Artuch R. and Sierra C. (1997) Tocopherol in inborn errors intermediary metabolism. *Clin. Chim. Acta.* 263, 147-155.
- Nyhan W.I. (1979) Phenylketonuria. In Bergsma D. (editor) *Birth defects compendium*, 2ª 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.
- Oyama Y., Hayashi A., Ueha T. and Maekawa K. (1994) Characterization of 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence in dissociated mammalian brain neurons: estimation on intracellular content of hydrogen peroxide. *Brain Res.* 635, 113-117.
- Paine R.S., Schmidt E., Matthis P., Kobialka B. and Sonnevile L. (1957) EEGs in phenylketonuria, I: Follow-up to adulthood; II: Short-term diet-related changes in EEGs and cognitive function. *Develop. Med. Child. Neurol.* 35, 54-64.
- 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. Invest.* 103, 1169-1178.
- Pollitt R.J. (2006) International perspectives on newborn screening. *J. Inher. 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.
- Rech V.C., Feksa L.R., Dutra-Filho C.S., Wyse A.T., Wajner M. and Wannmacher C.M. (2002) Inhibition of the mitochondrial respiratory chain by phenylalanine in rat cerebral cortex. *Neurochem. Res.* 27, 353-357.
- 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.
- Rodrigues N.R., Wannmacher C.M.D., Dutra-Filho C.S., Pires R.F., Fagan P.R. and Wajner M. (1990) Effect of phenylalanine, p-chlorophenylalanine and  $\alpha$ -methylphenylalanine on glucose uptake in vitro by the brain of young rats. *Biochem. Soc. Trans.* 18, 419-428.
- 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.
- Sarkissian C.N., Scriver C.R. and Mamer A.O. (2000) Measurement of phenyllactate, phenylacetate and phenylpyruvate by negative ion chemical ionization-gas chromatography/mass spectrometry in brain of mouse genetic models of phenylketonuria and non-phenylketonuria hyperphenylalaninemia. *Analyt. Biochem.* 280, 242-249.
- 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.
- 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<sup>a</sup> ed. Volume II. New York: McGraw-Hill. Cap. 77, 1667-1724.
- Shah D.W.W., Weinberger E.D. and Maravilla K.R. (1990) Cranial MR in phenylketonuria. *J. Comp. Ass. Tomogr.* 14, 458-460.

- 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.
- Swaiman K.E. and Wu S.R. (1984) Phenylalanine and phenylacetate adversely affect developing mammalian brain neurons. *Neurology* 34, 1246-1250.
- 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.
- 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*. 5ª edição. MacGraw-Hill, New York.

- Trefz F.K., Scheible D., Frauendienst-Egger G., Korall H. and Blau N. (2005) Long-term treatment of patients with mild and classical phenylketonuria by tetrahydrobiopterin. *Mol. Genet. Metab.* 86, S75-S80.
- Tsakiris S., Schulpis K.H., Tjamouranis J., Michelakaksi H. and Karikas G.A. (2002) Reduced acetylcholinesterase activity in erythrocyte membranes from patients with phenylketonuria. *Clin. Biochem.* 35, 615-619.
- Underfriend S. and Cooper J.R. (1952) The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. *J. Biol. Chem.* 194, 503-511.
- 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. Inher. Metab. 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.
- Weglage J., Oberwittler C., Marquardt T., Schellsheidt J., Teffelen-Heithoff A.V., Koch G. and Gerding H. (2000) Neurological deterioration in adult phenylketonuria. *J. Inher. Metab. Dis.* 23, 83-84.
- Wendel A. (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 77, 325-332.

- 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.
- Wyse A.T.S., Bolognese G., Brusque A.M., Wajner M. and Wannmacher C.M.D. (1995a)  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -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., Noriler M.E., Borges L.F., Foriano P.J., Silva C.G., Wajner M. and Wannmacher C.M.D. (1999) Alanine prevents the decrease of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase activity in experimental phenylketonuria. *Metab. Brain Dis.* 14, 95-101.
- 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.
- Wyse A.T.S., Wajner M. and Wannmacher C.M.D. (1998) Kinetics of alanine reversal on the inhibition of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase activity by phenylalanine and phenyllactate in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats. *Med. Sci. Res.* 26, 141-143.
- Wyse A.T.S., Wajner M., Brusque A.M. and Wannmacher C.M.D. (1995b) Alanine reverses the inhibitory effect of phenylalanine and its metabolites on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -

APTase in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of rats. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 2275.

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.