

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

**Investigação do estresse oxidativo em
pacientes com fenilcetonúria não tratados e
durante o tratamento dietético**

Angela Sitta

Orientadora: Prof^a Dr^a Carmen Regla Vargas

Co-orientador: Prof Dr Moacir Wajner

Porto Alegre, 2007

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

**Investigação do estresse oxidativo em
pacientes com fenilcetonúria não tratados e
durante o tratamento dietético**

Angela Sitta

Orientadora: Prof^a Dr^a Carmen Regla Vargas

Co-orientador: Prof Dr Moacir Wajner

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

Porto Alegre, 2007

Aos meus pais, Gladis e Waldir,
meus primeiros e grandes orientadores,
por todo incentivo, apoio e carinho.

Agradecimentos

À professora Carmen, querida orientadora, que com sua objetividade, competência e amizade tornou fácil e prazerosa a realização deste trabalho.

Ao professor Moacir, brilhante pesquisador, pelas importantes contribuições neste trabalho.

À Lisana Reginini Sirtori, colega e amiga, que teve grande contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Às colegas de pós-graduação Alethéa e Marion. Juntas trocamos idéias, dividimos trabalhos, mas, principalmente criamos um vínculo de carinho e amizade.

Às bolsistas de iniciação científica Maiara, Thati, Amanda e Marcella, fundamentais na realização deste trabalho.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Análise de Metabólitos do Serviço de Genética Médica do HCPA: Dani, Sharon, Renata, Grazi, Ânderson, Estela e Anelise, pelos bons momentos que passamos juntos.

Ao departamento de Bioquímica da UFRGS e em especial aos colegas do laboratório 38.

Ao CNPq pela bolsa que me foi concedida.

Ao Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por possibilitar que esse trabalho fosse desenvolvido, e em especial ao Régis, sempre muito prestativo na disponibilização das amostras dos pacientes.

Aos pacientes que fizeram parte desse estudo e às suas famílias, meu sincero agradecimento e desejo de que, em um futuro próximo, a ciência lhes traga algo melhor.

À Pati, minha amigona do coração, que sempre esteve disposta a me ajudar. Ao Gus, colega e amigo, pelas conversas e conselhos.

Ao Antônio, por estar ao meu lado nos momentos mais importantes da realização deste trabalho e da minha vida.

À minha família querida pelo torcida, carinho e incentivo.

Aos meus pais amados, meus alicerces, exemplos de caráter e honestidade, por sempre acreditarem em mim e nos meus sonhos.

Ao João, capaz de, com um simples sorriso, recarregar minhas energias e me reanimar para seguir adiante.

A Deus, pela proteção.

**“Bom mesmo é ir à luta com
determinação, abraçar a vida e
viver com paixão, perder com classe
e vencer com ousadia, porque o
mundo pertence a quem se atreve
e a vida é muito para ser
insignificante”**

Charlie Chaplin

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	2
LISTA DE ABREVIATURAS	3
I. INTRODUÇÃO	4
I.1 Erros inatos do metabolismo	4
I.2 Hiperfenilalaninemias e Fenilcetonúria	6
I.3 Radicais livres	11
I.4 Defesas antioxidantes	13
I.5 Estresse oxidativo	14
II. OBJETIVOS	17
II.1 Objetivo geral	17
II.2 Objetivos específicos	17
III. RESULTADOS	19
III.1 CAPÍTULO I – ARTIGO 01	19
<i>Oxidative stress in patients with phenylketonuria</i>	19
III.2 CAPÍTULO II – ARTIGO 02	26
<i>Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients</i>	26
IV. DISCUSSÃO	37
V. CONCLUSÕES	47
VI. PERSPECTIVAS	49
VII. REFERÊNCIAS	51
ANEXO 1 – Lista de figuras	61
ANEXO 2 – Parecer da comissão científica e da comissão de pesquisa e ética em saúde do HCPA	62

RESUMO

A fenilcetonúria é um erro inato do metabolismo dos aminoácidos, bioquimicamente caracterizado pela deficiência da atividade da fenilalanina hidroxilase, enzima que catalisa a hidroxilação da fenilalanina em tirosina, na presença do cofator tetraidrobiopterina. A deficiência desta enzima leva ao acúmulo de fenilalanina no plasma e tecidos dos pacientes fenilcetonúricos. A principal característica clínica desses pacientes é retardo mental e outros achados neurológicos, cuja base bioquímica ainda é um enigma. No presente trabalho, investigamos o papel do estresse oxidativo na fisiopatologia da fenilcetonúria. Primeiramente, avaliamos diversos parâmetros de estresse oxidativo em plasma e eritrócitos de pacientes fenilcetonúricos no momento do diagnóstico (pacientes com idade entre 2 e 20 anos). Observamos que as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico estavam marcadamente aumentadas, enquanto a medida da reatividade antioxidante total estava significativamente diminuída em plasma e a atividade da enzima antioxidante glutatona peroxidase estava reduzida em eritrócitos de pacientes fenilcetonúricos ao diagnóstico. Em seguida, avaliamos alguns parâmetros de estresse oxidativo em amostras de pacientes submetidos ao tratamento para a fenilcetonúria, que consistiu em uma dieta pobre em fenilalanina, através da eliminação de alimentos com alto conteúdo protéico, associada à administração de uma fórmula especial contendo outros aminoácidos essenciais. Investigamos dois grupos de pacientes tratados, um grupo com boa resposta bioquímica ao tratamento dietético e outro com altos níveis plasmáticos de fenilalanina, com o intuito de avaliar se as concentrações sanguíneas deste aminoácido estão correlacionadas com o estresse oxidativo. Encontramos um aumento significativo das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico no plasma, assim como uma diminuição significativa da medida da reatividade antioxidante total em ambos os grupos de pacientes estudados. Além disso, encontramos uma diminuição significativa da atividade da glutatona peroxidase em eritrócitos dos dois grupos estudados. Não observamos correlação significativa entre os níveis sanguíneos de fenilalanina e os parâmetros de estresse oxidativo estudados. Nossos resultados nos permitem concluir que o estresse oxidativo ocorre em pacientes fenilcetonúricos e, possivelmente, esteja relacionado com a fisiopatologia do dano neurológico encontrado na doença. Além disso, nossos resultados indicam que o estresse oxidativo na fenilcetonúria pode não estar diretamente relacionado com os níveis sanguíneos da fenilalanina.

ABSTRACT

Phenylketonuria is an inborn error of amino acid metabolism, biochemically characterized by phenylalanine hydroxylase activity deficiency, enzyme that catalyzes the hydroxylation of phenylalanine to tyrosine, in the presence of the cofactor, tetrahydrobiopterin. The deficiency of this enzyme leads to the accumulation of phenylalanine in plasma and tissues of phenylketonuric patients. The main clinical characterization of these patients is mental retardation and other neurological features, whose biochemical basis is an enigma. In the present work we investigated the role of oxidative stress in the pathophysiology of phenylketonuria. First, we evaluated various oxidative stress parameters in plasma and erythrocytes of phenylketonuric patients at diagnosis (patients aged between 2 and 20 years). We observed that thiobarbituric acid-reactive species was markedly increased, whereas total antioxidant activity measurement was significantly decreased in plasma and the activity of antioxidant enzyme glutathione peroxidase was reduced in erythrocytes from phenylketonuric patients at diagnosis. Next, we evaluated some parameters of oxidative stress in samples of patients under treatment for phenylketonuria, that was based on a low-phenylalanine diet by eliminating high-protein foods, associated with a special formula containing others essentials amino acids. We investigated two groups of treated patients, one with a good biochemical response to dietary treatment and the other with high phenylalanine blood levels, in order to evaluate if phenylalanine blood concentration is correlated to oxidative stress. We found a significant increase of plasma thiobarbituric acid-reactive species and a significant decrease of total antioxidant reactivity measurement in both groups of studied patients. Moreover, we found a decrease of glutathione peroxidase activity in erythrocytes of two groups studied. No correlation was observed between phenylalanine blood levels and the oxidative stress parameters studied. Our results allow to conclude that oxidative stress is induced in phenylketonuric patients, and possibly is related to pathophysiology of neurological damage in phenylketonuria. Moreover, our results indicate that oxidative stress in phenylketonuria may not be directly related to phenylalanine blood levels.

LISTA DE ABREVIATURAS

BH₄ – tetraidrobiopterina

BHE – barreira hemato encefálica

CAT – catalase

EIM – erros inatos do metabolismo

ERO – espécies reativas de oxigênio

ERN – espécies reativas de nitrogênio

GR – glutathione redutase

GSH – glutathione reduzida

GSH-Px – glutathione peroxidase

GSSG – glutathione oxidada

HPA – hiperfenilalaninemias

MSUD – Doença da Urina do Xarope do Bordo

NADP⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

PA - fenilacetato

PAH – fenilalanina hidroxilase

Phe – fenilalanina

PKU – fenilcetonúria

PL – fenilactato

PLP – piridoxal-5'-fosfato

PPA – fenilpiruvato

Q-10 – ubiquinona-10

RL – radical livre

SNC – sistema nervoso central

SOD – superóxido dismutase

TAR – reatividade antioxidante total

TAS – *status* antioxidante total

TBA-RS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

Tyr – tirosina

I. INTRODUÇÃO

I.1 Erros inatos do metabolismo

A primeira menção ao termo erros inatos do metabolismo (EIM) data de 1908 e foi descrita por Garrod em seus estudos realizados com pacientes com alcaptonúria, doença em que os afetados excretam grandes quantidades de ácido homogentísico na urina. Garrod observou que freqüentemente um ou mais indivíduos da mesma família eram afetados sem que seus pais ou demais parentes apresentassem a doença. Baseado também na observação da maior incidência de consangüinidade entre os pais dos pacientes e nas leis de Mendel, Garrod, juntamente com Bateson, um geneticista inglês, propôs um modelo de herança autossômica recessiva para esse distúrbio, observando ainda que a alcaptonúria e outras anomalias metabólicas herdadas eram raras e incomuns (Waber, 1990; Scriver et al., 2001).

Desde os estudos de Garrod, muitos pesquisadores têm detectado novas doenças metabólicas hereditárias e os erros inatos do metabolismo já foram descritos em todas as áreas do metabolismo humano normal (aminoácidos, ácidos orgânicos, lipídios, carboidratos, etc.) (Scriver et al., 2001).

Os erros inatos do metabolismo são caracterizados pela síntese alterada de uma proteína, geralmente uma enzima, com atividade parcial ou totalmente reduzida. Essa alteração resulta no bloqueio da via metabólica com conseqüente acúmulo de seus substratos e outros derivados deles, bem como diminuição da síntese do produto. Tal bloqueio, dependendo da via afetada, repercute clinicamente de maneira

bastante variável no indivíduo, sendo geralmente de sintomatologia grave e muitas vezes letal (Scriver et al., 2001).

Os EIM são individualmente raros, porém, em conjunto, atingem um a cada mil nascimentos, correspondendo a cerca de 10% de todas as doenças genéticas. Até o momento, foram descritos aproximadamente 500 distúrbios envolvendo defeitos na síntese, degradação, armazenamento e transporte de moléculas no organismo (Gimenez-Sanchez et al, 2001).

Os EIM podem ser classificados de diversas maneiras, como pela idade de apresentação dos sintomas ou pela área do metabolismo afetada. Os erros inatos do metabolismo intermediário podem levar à intoxicação aguda ou crônica por acúmulo de componentes tóxicos e de metabólitos produzidos devido ao defeito de rotas metabólicas. Fazem parte deste grupo as aminoacidopatias (ex. fenilcetonúria, tirosinemia, doença do Xarope do Bordo, etc.), as acidemias orgânicas (ex. acidemia propiônica, acidemia metilmalônica, etc.), os defeitos no ciclo da uréia (ex. citrulinemia, argininemia, etc.) e as intolerâncias aos açúcares (ex. galactosemia, etc.) (Saudubray e Charpentier, 2001). Estudos revelam que aproximadamente um terço dos EIM correspondem a aminoacidopatias, outro terço a acidemias orgânicas e o outro terço corresponde a todo o restante (Hoffmann, 1994), O presente trabalho tratará do erro inato do metabolismo intermediário do aminoácido essencial fenilalanina, denominado fenilcetonúria (PKU).

1.2 Hiperfenilalaninemias e Fenilcetonúria

Hiperfenilalaninemia (HPA) é o nome genérico dado a diferentes distúrbios caracterizados por elevados níveis de fenilalanina (Phe) no sangue. As HPA podem ser classificadas de acordo com os níveis séricos de Phe ou com a tolerância à Phe da dieta, podendo ser divididas em:

a) Hiperfenilalaninemia Persistente Benigna – condição na qual os níveis de Phe no sangue permanecem entre 2 e 6mg/dL, sem prejuízo ao paciente, e a atividade enzimática da fenilalanina hidroxilase é em torno de 1 a 5% do normal (Smith e Lee, 2000);

b) Hiperfenilalaninemia Transitória – condição causada pela imaturidade temporária da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), caracterizada por níveis plasmáticos elevados de Phe logo após o nascimento que regridem após poucas semanas de vida pós-natal (Smith e Lee, 2000; Scriver et al, 2001);

c) Fenilcetonúria Materna – síndrome teratogênica em filhos de mães fenilcetonúricas, que apresentaram níveis de Phe plasmáticos elevados durante a gestação. É caracterizada por baixo peso ao nascimento, microcefalia, retardo mental e dismorfias faciais (Clarke, 1996; Lyon et al, 1996);

d) Fenilcetonúria Clássica (PKU) – condição causada pela deficiência na enzima fenilalanina hidroxilase, na qual os níveis de Phe sanguínea são costumeiramente maiores que 10mg/dL e a atividade enzimática é menor do que 1% do normal (Smith e Lee,2000).

A PKU é, provavelmente, o erro inato do metabolismo dos aminoácidos mais estudado e conhecido na atualidade. Sua primeira descrição data de 1934, quando

Fölling observou a reação entre o fenilpiruvato excretado na urina de pacientes fenilcetonúricos e o cloreto férrico (FeCl_3), que conferia à urina uma coloração verde oliva (Stryer et al., 2002).

A PKU é um dos erros inatos do metabolismo de maior prevalência mundial, variando de 1:10.000 a 1:20.000 nascidos vivos, dependendo das características da população de estudo (Scriver et al, 2001a; Stryer et al, 2002). Na América Latina, a PKU é o EIM mais freqüentemente diagnosticado, o que ocorre não somente devido à sua elevada freqüência, mas também pela simplicidade da técnica diagnóstica e pelos avanços nos programas de rastreamento neonatal (Giugliani e Coelho, 1997). No Brasil, o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) foi implantado em 2001, e hoje já está implementado nos 27 estados, sendo que a PKU faz parte da triagem em todos eles.

Como a grande maioria dos EIM, a PKU apresenta herança autossômica recessiva, o que significa um risco de recorrência para a prole de 25% a cada gestação de um casal heterozigoto portador. Em indivíduos homozigotos, a atividade enzimática pode apresentar-se bastante reduzida ou mesmo estar ausente. Os heterozigotos, que representam cerca de 1,5% de uma população típica, não manifestam a doença, pois um alelo normal determina síntese suficiente da enzima (Marzzoco e Torres, 1990).

A doença é caracterizada bioquimicamente pela ausência ou deficiência da atividade da enzima hepato-específica fenilalanina hidroxilase (PAH) ou, mais raramente, de seu cofator, a tetraidrobiopterina (BH_4). A PAH é a enzima responsável pela primeira reação na via de degradação da Phe, catalisando a sua hidroxilação em tirosina (Tyr) (Figura 1). Logo, uma deficiência nessa enzima pode levar ao

acúmulo do substrato Phe a níveis bastante elevados, além da ocorrência de reações paralelas, como a transaminação da Phe com o piruvato produzindo o metabólito fenilpiruvato (Figura 2). Além disso, ocorre a diminuição da concentração do produto Tyr, responsável pela biossíntese de diversos neurotransmissores, como dopamina e norepinefrina (Lehninger, 2004).



Figura 1 – Metabolismo da fenilalanina e bloqueio metabólico da enzima fenilalanina hidroxilase característico da fenilcetonúria (Adaptado de Lehninger, 2004)

Normalmente, 75% da fenilalanina é transformada em tirosina, enquanto apenas 25% é incorporada em proteínas. Como a principal via catabólica da Phe está bloqueada na PKU, pacientes afetados por essa doença apresentam níveis sanguíneos desse aminoácido até 20 vezes maiores que pessoas saudáveis (Stryer et al, 2002). Além da Phe, fenilpiruvato (PPA) e outros metabólitos anormais também

se acumulam no sangue e tecidos dos pacientes fenilcetonúricos e são secretados em níveis elevados na urina desses pacientes. O nome da doença deriva dos altos níveis de fenilpiruvato, uma fenilcetona, encontrado na urina de crianças afetadas (Cooper, 2000).

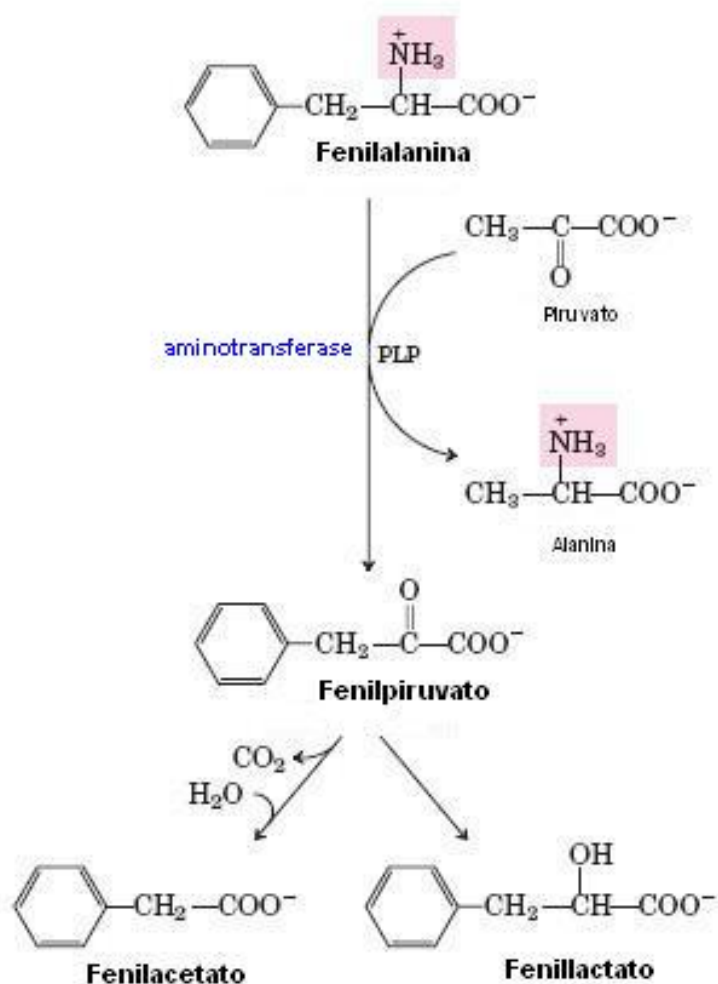


Figura 2 – Rotas alternativas para o catabolismo da fenilalanina na fenilcetonúria (Adaptado de Lehninger, 2004).

O diagnóstico da PKU clássica é usualmente feito pela detecção de elevadas concentrações séricas de Phe em sangue venoso ou sangue total coletado em papel filtro. Concentrações sangüíneas acima de 10mg/dL são compatíveis com o

diagnóstico de PKU clássica. A dosagem do cofator tetraidrobiopterina em soro e urina de pacientes hiperfenilalaninêmicos permite determinar se a doença está sendo provocada pela sua deficiência, o que é importante para a instituição do tratamento adequado, que normalmente inclui a reposição oral do cofator.

Embora a PAH seja uma enzima hepática, as principais manifestações clínicas da fenilcetonúria correspondem a alterações neurológicas. Quase a totalidade dos pacientes fenilcetonúricos não tratados apresenta retardo mental grave. O peso cerebral dos pacientes é inferior ao de pessoas saudáveis e eles apresentam defeitos na mielinização e reflexos hiperativos. A expectativa de vida dos pacientes não tratados é reduzida drasticamente. Embora muitos estudos venham sendo conduzidos, as bases bioquímicas do retardo mental na PKU ainda permanecem obscuras (Scriver et al, 2001a).

Os pacientes fenilcetonúricos são normais ao nascimento, mas os primeiros danos neurológicos podem surgir antes do primeiro ano de vida, caso não recebam o tratamento recomendado (Cooper, 2000). O diagnóstico precoce da PKU é, portanto, essencial para a qualidade de vida do paciente. Tendo isso em vista, além da alta incidência da PKU em muitas populações, ela é hoje alvo de programas de triagem neonatal em muitos países, incluindo o Brasil. A PKU foi o primeiro EIM incluído em programas de triagem neonatal no mundo.

O tratamento preconizado para a PKU é baseado numa dieta com baixo teor de Phe, na qual alimentos de origem animal são pouco utilizados, resultando em baixa ingestão de proteínas de alto valor biológico. Essa alimentação é geralmente suplementada com uma mistura de aminoácidos, livre de Phe, enriquecida com micronutrientes essenciais como vitaminas, minerais e elementos traços (Przyrembel

e Bremer, 2000). A quantidade de Phe que pode ser ingerida depende dos níveis de Phe no plasma, da atividade da PAH e da tolerância à Phe, que podem variar de indivíduo para indivíduo (Mönch et al, 1996; Prince et al, 1997).

O tratamento da PKU, se iniciado precocemente e adequadamente prescrito é bastante eficaz. Sabe-se que pacientes com boa aderência ao tratamento não apresentam o retardo mental característico de pacientes fenilcetonúricos não tratados, embora possam apresentar um QI baixo (Holtzman et al, 1986; Smith et al, 1990) e déficits neuropsicológicos (Lou et al, 1985; Krause et al, 1985).

1.3 Radicais livres

Um radical livre (RL) é uma estrutura química que possui um elétron desemparelhado, ou seja, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho. Isso o torna muito instável, extraordinariamente reativo e com uma enorme capacidade para combinar-se inespecificamente com as diversas moléculas integrantes da estrutura celular e derivados de cada uma delas (Halliwell e Gutteridge, 2001; Southorn e Powis, 1988).

Várias são as fontes geradoras de radicais livres. Afinal, os sistemas biológicos são expostos a radicais livres que são formados endogenamente (subprodutos do metabolismo aeróbico) ou que são resultados de influências externas, como a radiação ionizante e a exposição à radiação eletromagnética (Southorn e Powis, 1988; Wulf, 2001).

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o oxigênio molecular (O_2) sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (H_2O). No entanto, aproximadamente 5% do oxigênio utilizado na cadeia respiratória mitocondrial não é completamente reduzido à água, podendo ser convertido a intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxila (OH^{\cdot}) e também o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), processo que pode ser exacerbado em condições fisiológicas (Boveris e Chance, 1973).

O termo genérico espécies reativas de oxigênio (ERO) é usado para incluir não só os radicais formados pela redução do O_2 ($O_2^{\cdot-}$ e OH^{\cdot}), mas também alguns não-radicaais derivados do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio *singlet* (1O_2) (Halliwell e Gutteridge, 2001). Além dessas, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo o óxido nítrico (NO^{\cdot}) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) as principais representantes.

As ERO e as ERN ocorrem tanto em processos fisiológicos quanto patológicos do organismo. Quando formadas em excesso, essas moléculas altamente reativas têm o potencial de oxidar moléculas biológicas incluindo proteínas, lipídios e DNA (Maxwell, 1995). Com relação aos efeitos prejudiciais das reações oxidantes ao organismo, os radicais livres podem promover lipoperoxidação, podem causar a oxidação de proteínas de baixa densidade (LDL), podem reagir com proteínas, levando à sua inativação e podem também reagir com DNA e RNA, levando a mutações somáticas e a distúrbios de transcrição (Delanty e Dichter, 1998).

1.4 Defesas antioxidantes

Para evitar o dano celular que pode ser causado pela formação de radicais livres, os sistemas biológicos desenvolveram mecanismos de defesa antioxidante, convertendo as espécies reativas em derivados inativos (Halliwell, 1994). Esses sistemas de defesas podem ser divididos em enzimáticos e não-enzimáticos.

As enzimas antioxidantes agem impedindo a geração de espécies reativas, bem como as removendo. Dentre os principais antioxidantes enzimáticos estão a enzima superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação de dois radicais superóxidos, formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2), a enzima catalase, que é responsável pela degradação do H_2O_2 , formando água (H_2O) e O_2 e a enzima glutathione peroxidase (GSH-Px), que catalisa a decomposição de hidroperóxidos, utilizando glutathione reduzida (GSH) como substrato para formar glutathione oxidada (GSSG) e o produto de redução do hidroperóxido. Fisiologicamente, a GSH-Px atua acoplada à enzima glutathione reductase (GR) que, por sua vez, catalisa a redução de GSSG, usando NADPH como coenzima (Halliwell, 2001; Bonnefoy et al, 2002; Salvador e Henriques, 2004). A figura 3 mostra a redução do O_2 à água, os sítios de formação de RLs e a ação das enzimas antioxidantes.

Além das enzimas antioxidantes, o organismo tem a capacidade de sintetizar compostos não-enzimáticos que apresentam, direta ou indiretamente, grande capacidade de defesa antioxidante, atuando a fim de manter o estado de equilíbrio celular. São exemplos deles bilirrubina, ácido úrico, melatonina, estrógeno e

glutathiona (Halliwell e Gutteridge 2001). Alguns antioxidantes não podem ser sintetizados pelo organismo, devendo ser ingeridos na dieta. Dentre estes antioxidantes não-enzimáticos, podem-se citar vitaminas, como as vitaminas A, C, E, riboflavina e tiamina e os polifenóis (Salvador e Henriques, 2004).

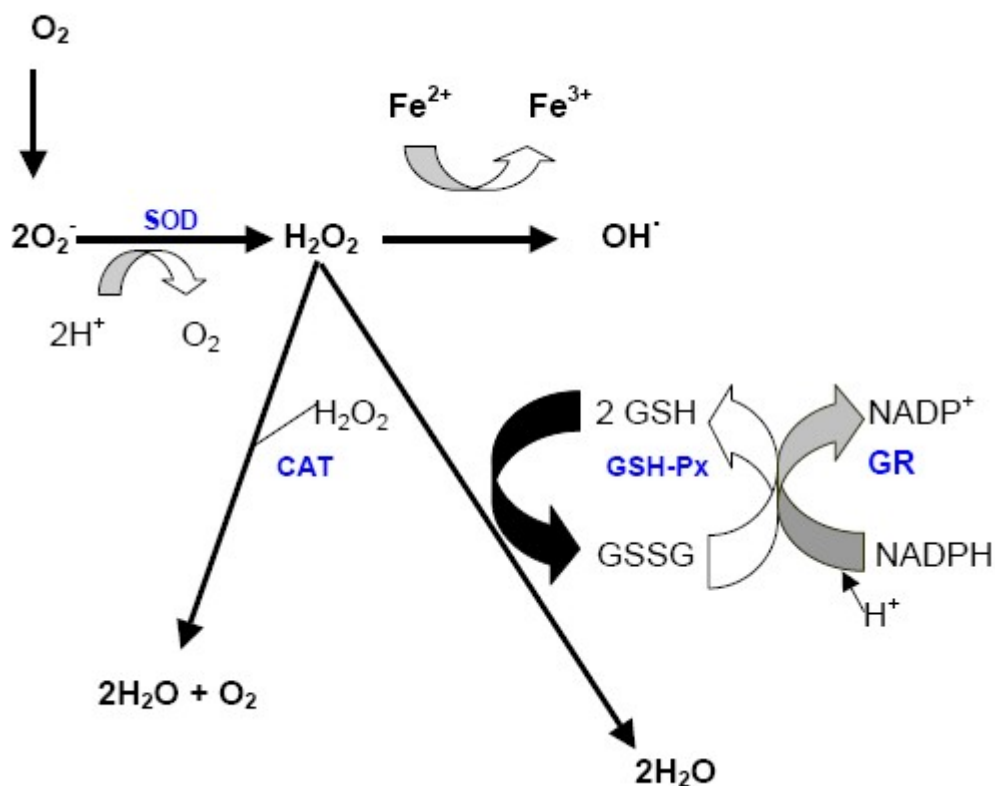


Figura 3. Redução do oxigênio à água (Adaptado de Marks, 1996).

1.5 Estresse oxidativo

Os radicais livres são formados em condições fisiológicas em proporções controladas pelos mecanismos defensivos celulares. Entretanto, em situações

patológicas, essa produção pode aumentar substancialmente. O estresse oxidativo pode resultar de uma situação em que há uma diminuição nos níveis das defesas antioxidantes, uma elevada velocidade de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou uma combinação de ambos (Salvador e Henriques, 2004). Portanto, o termo estresse oxidativo se refere ao desequilíbrio entre a capacidade antioxidante e as espécies reativas produzidas (pró-oxidantes), em favor destas (Halliwell e Gutteridge, 2001).

O desequilíbrio pró-oxidante/antioxidante pode causar danos a todos os tipos de biomoléculas (DNA, proteínas e lipídios). Dentre as principais conseqüências secundárias ao estresse oxidativo em sistemas biológicos estão a lipoperoxidação da membrana celular, a oxidação de proteínas e a lesão DNA/RNA celular (Halliwell e Gutteridge, 2001).

Existem evidências crescentes de que o estresse oxidativo desempenha um importante papel em várias condições clínicas, como neoplasias, diabetes, aterosclerose, doenças neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica, inflamações crônicas e doenças neurológicas (Reznick e Packer, 1993; Przedborski et al, 1996; Ben-Menachem et al, 2000).

O cérebro é um órgão bastante suscetível ao estresse oxidativo, por consumir grandes quantidades de oxigênio. Além disso, o metabolismo de alguns dos principais neurotransmissores, como glutamato e dopamina, gera ERO capazes de consumir as defesas antioxidantes, que são baixas em muitas regiões do cérebro. Ainda, as membranas neuronais contêm níveis elevados de lipídios poliinsaturados capazes de sofrer peroxidação lipídica, além de ferro, também suscetível ao estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2001).

O estresse oxidativo também vem sendo observado em alguns erros inatos do metabolismo intermediário (Wajner et al, 2004). Foi verificado que a geração de radicais livres pode participar da disfunção neurológica de algumas acidemias orgânicas, como nas acidemias propiônica e metilmalônica (Fontella et al, 2000) e na acidemia glutárica (Kolker et al, 2001; Latini et al 2002, 2003a,b); em aminoacidopatias, como na tirosinemia tipo I (Bird et al, 1995), na Doença da Urina do Xarope do Bordo (Barschak et al, 2006; Bridi et al, 2003, 2005a,b) e na homocistinúria (Matté et al, 2004; Streck et al, 2003); e na Adrenoleucodistrofia ligada ao X, uma desordem peroxissomal (Vargas et al, 2004; Deon et al, 2006).

Embora a causa do estresse oxidativo nos EIM ainda não seja inteiramente compreendida, imagina-se que possa ser devida ao acúmulo de metabólitos tóxicos, que levariam a uma produção aumentada de radicais livres. Além disso, dietas restritas, aplicadas em muitos pacientes afetados por EIM, podem também alterar o *status* antioxidante do organismo (Artuch, et al, 2004). Nesse contexto, o estresse oxidativo vem sendo demonstrado em modelos animais de HPA, incluindo a PKU (Hagen et al, 2002; Ercal et al, 2002; Martinez-Cruz et al, 2002) e também em pacientes tratados com uma dieta pobre em Phe, nos quais avaliou-se o *status* antioxidante (Schulpis et al, 2003; Schulpis et al, 2005).

II. OBJETIVOS

II.1 Objetivo geral

Levando-se em consideração que a fisiopatologia do dano neurológico na fenilcetonúria ainda não está completamente esclarecida e que um número crescente de estudos vêm demonstrando a ocorrência de estresse oxidativo em diversos erros inatos do metabolismo, incluindo a PKU, avaliamos a contribuição do estresse oxidativo na fenilcetonúria, investigando diversos parâmetros bioquímicos em amostras de plasma e eritrócitos de pacientes antes e durante o tratamento dietético preconizado para a doença.

II.2 Objetivos específicos

Capítulo I - Avaliar o parâmetro de lipoperoxidação através da medida das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e a medida da reatividade antioxidante total (TAR) em plasma, bem como as defesas enzimáticas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) em eritrócitos de pacientes fenilcetonúricos no momento do diagnóstico.

Capítulo II - Avaliar o parâmetro de lipoperoxidação através da medida das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e a medida da reatividade antioxidante total (TAR) em plasma, bem como as defesas enzimáticas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) em

eritrócitos de dois grupos de pacientes fenilcetonúricos sob tratamento dietético: um grupo com uma boa resposta ao tratamento e outro com níveis plasmáticos de fenilalanina (Phe) elevados, com o intuito de avaliar se há correlação entre os níveis de Phe e os parâmetros de estresse oxidativo.

OBS: Os capítulos I e II serão apresentados na forma de artigos científicos.

III. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na forma de artigos científicos.

III.1 CAPÍTULO I – ARTIGO 01

Oxidative stress in patients with phenylketonuria

L.R. Sirtori, C. S. Dutra-Filho, D. Fitarelli, A. Sitta, A. Haeser, A.G. Barschak, M.

Wajner, D.M. Coelho, A. Belló-Klein, R. Giugliani, M. Deon, C.R. Vargas

Periódico: Biochimica et Biophysica Acta

Status: Publicado

Oxidative stress in patients with phenylketonuria

L.R. Sirtori^a, C.S. Dutra-Filho^c, D. Fitarelli^a, A. Sitta^a, A. Haeser^a, A.G. Barschak^b, M. Wajner^{a,c},
D.M. Coelho^b, S. Llesuy^d, A. Belló-Klein^e, R. Giugliani^a, M. Deon^a, C.R. Vargas^{a,b,*}

^aMedical Genetics Service, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350 CEP 90.035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

^bDepartment of Analysis, Pharmacy Faculty, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

^cDepartment of Biochemistry, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

^dInstitute of Biochemistry and Biophysics, School of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

^eLaboratory of Cardiovascular Physiology, Department of Physiology, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

Received 24 November 2004; received in revised form 6 February 2005; accepted 9 February 2005

Available online 25 February 2005

Abstract

Phenylketonuria (PKU) is an autosomal recessive disease caused by phenylalanine-4-hydroxylase deficiency, which is a liver-specific enzyme that catalyzes the hydroxylation of L-phenylalanine (Phe) to L-tyrosine (Tyr). The deficiency of this enzyme leads to the accumulation of Phe in the tissues and plasma of patients. The clinical characterization of this disease is mental retardation and other neurological features. The mechanisms of brain damage are poorly understood. Oxidative stress is observed in some inborn errors of intermediary metabolism owing to the accumulation of toxic metabolites leading to excessive free radical production and may be a result of restricted diets on the antioxidant status. In the present study we evaluated various oxidative stress parameters, namely thiobarbituric acid-reactive species (TBA-RS) and total antioxidant reactivity (TAR) in the plasma of PKU patients. The activities of the antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were also measured in erythrocytes from these patients. It was observed that phenylketonuric patients present a significant increase of plasma TBA-RS measurement, indicating a stimulation of lipoperoxidation, as well as a decrease of plasma TAR, reflecting a deficient capacity to rapidly handle an increase of reactive species. The results also showed a decrease of erythrocyte GSH-Px activity. Therefore, it is presumed that oxidative stress is involved in the pathophysiology of the tissue damage found in PKU.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Phenylketonuria; Oxidative stress; Free radical

1. Introduction

Phenylketonuria (PKU) is an autosomal recessive disease caused by deficiency of phenylalanine-4-hydroxylase, which is a liver-specific enzyme that catalyzes the hydroxylation of L-phenylalanine (Phe) to L-tyrosine (Tyr) in the presence of the cofactor, tetrahydrobiopterin (BH₄). The deficiency of this enzyme leads to the accumulation of

Phe in the tissues and plasma of patients. The incidence in Caucasians is approximately 1:10,000 [1].

High Phe levels interfere with the production of the neurotransmitters dopamine and noradrenaline [2]. Phe decreases the availability of tryptophan (Trp) and Tyr [3] and causes serotonin and catecholamine depletion in PKU [4] thus influencing brain function. Additionally, high Phe concentrations were found to influence several mechanisms such as neural excitability, axonal conduction [1,5] and synaptic transmission velocity [6]. It was also demonstrated that Na⁺,K⁺-ATPase activity is reduced in the synaptic plasma membrane of animal models of PKU [7,8].

* Corresponding author. Medical Genetics Service, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350 CEP 90.035-003, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 21018011; fax: +55 51 21018010.

E-mail address: crvargas@hcpa.ufrgs.br (C.R. Vargas).

Therapy is based on a low-Phe diet by eliminating high-protein foods, enabling children with PKU to develop normally [9]. As a substitute for proteins, PKU patients consume an artificial amino acid mixture that does not contain Phe; such mixtures are enriched with vitamins and minerals [10]. Unfortunately, many PKU patients do not adhere strictly to this diet, resulting in uncontrolled high Phe blood levels. In PKU, Phe plasma concentrations may reach 400–1800 $\mu\text{mol/L}$ and are harmful especially during the first year of life [5,11,12]. This condition leads to severe retardation of intellectual development, neuropsychiatric symptoms and seizures [13].

Free radicals seem to be involved in a large number of human diseases. Increasing evidence has shown that damage caused by free radicals is an important contributing factor in chronic-inflammatory, vascular, neoplastic and neurodegenerative diseases including Parkinson's disease, Alzheimer's disease, strokes, multiple sclerosis, epilepsy, etc. [14–17]. The brain has relatively low levels of antioxidant defenses, high lipid content, specially unsaturated fatty acids and catecholamines, which are highly susceptible to reactive oxygen species attack.

Oxidative stress was observed in some inborn errors of intermediary metabolism owing to the accumulation of toxic metabolites leading to excessive free radical production [18]. Restricted diets also alter the antioxidant status in some inborn errors of metabolism [19,20]. In this context, oxidative stress has been demonstrated in animal models of hyperphenylalaninemia and PKU [21–23].

Our objective in the present study was to evaluate various parameters of oxidative stress such as thiobarbituric acid-reactive species (TBA-RS) and total antioxidant reactivity (TAR) in the plasma and the activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) in erythrocytes from PKU patients in order to verify whether free radicals may be involved in the pathophysiology of the tissue damage in these patients.

2. Material and methods

2.1. Patients and controls

A total of 20 PKU patients aged between 2 and 20 years was used to evaluate the parameters of oxidative stress. Samples (plasma from 20 patients and erythrocytes from 4 patients) were obtained at the time of the diagnosis of the index cases in our laboratory, which consisted of the determination of increased plasma levels of Phe by a fluorimetric method [24]. For analysis were used samples whose plasma levels of Phe were at least 600 $\mu\text{mol/L}$ and the mean value for the PKU samples was 1160 $\mu\text{mol/L}$. The period between blood collection and analysis was always less than 2 weeks. Plasma and erythrocytes were

also obtained from healthy age matched individuals used as the control group. Samples were kept frozen until analysis.

2.2. Reagents

All chemicals were of PA purity and were purchased from Sigma (St. Louis, MO) except by TBA, which was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). TAR was assayed using a beta liquid scintillation spectrometer (Wallac model 1409). TBA-RS and antioxidant enzyme activities were measured with a double-beam spectrophotometer with temperature control (Hitachi U-2001).

2.3. Erythrocytes and plasma preparation

Erythrocytes and plasma were prepared from whole blood samples obtained from fasting individuals (controls and PKU patients) by venous puncture with heparinized vials. Whole blood was centrifuged at $1000\times g$, plasma was removed by aspiration and frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until determination. Erythrocytes were washed three times with cold saline solution (sodium chloride 0.153 mol/L). Lysates were prepared by the addition of 100 μL of washed erythrocytes to 1 mL of distilled water and frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the determination of the antioxidant enzyme activities.

For antioxidant enzyme activity determination, erythrocytes were frozen and thawed three times, centrifuged at $13500\times g$ for 10 min. The supernatant was diluted to approximately 0.5 mg/mL of protein.

2.4. Thiobarbituric acid-reactive species (TBA-RS)

Thiobarbituric acid-reactive species (TBA-RS) were determined according to the method described by Esterbauer and Cheeseman (1990) [25]. Briefly, 300 μl of 10% trichloroacetic acid was added to 150 μl of plasma and centrifuged at $1000\times g$ for 10 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Three hundred microliters of the supernatant was transferred to a test tube and incubated with 300 μl 0.67% thiobarbituric acid (in 7.1% sodium sulfate) at $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 25 min. The mixture was allowed to cool on water for 5 min. The resulting pink stained TBA-RS were determined in a spectrophotometer at 535 nm. Calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane subjected to the same treatment as that of the supernatants. TBA-RS were calculated as nmol TBA-RS/mg protein.

2.5. Total antioxidant reactivity (TAR)

TAR, which represents the quality of the tissue antioxidants, was determined by measuring the luminol chemiluminescence intensity induced by *z,z'*-azo-bis-(2-amidinopropane) (ABAP) according to the method of Lissi et al. (1992) [26]. The background chemilumines-

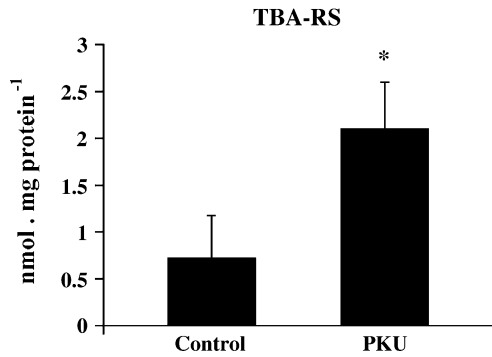


Fig. 1. Plasma thiobarbituric-acid reactive species (TBA-RS) from PKU patients and controls. Data represent the mean \pm S.D. ($n=20$). Difference from control, * $P<0.05$ (Student's t test for non-paired samples).

cence was measured by adding 4 mL of 2 mM ABAP (in 0.1 M glycine buffer, pH 8.6) into a glass scintillation vial. Fifteen microliters of luminol (4 mM) was added to each vial and the chemiluminescence was measured. This was considered to be the basal value. Ten microliters of 10 μ M Trolox or plasma was then added and the chemiluminescence was measured during 60 s. The Trolox or supernatant addition reduces the chemiluminescence. The rapid reduction in luminol intensity is considered as a measure of the TAR capacity. TAR measurement was calculated as nmol Trolox/mg protein.

2.6. Antioxidant enzyme activities

2.6.1. Catalase assay (CAT)

CAT activity was assayed by the method of Aebi (1983) [27] measuring the absorbance decrease at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H_2O_2 , 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and 0.1–0.3 mg protein/ml. One unit of the enzyme is defined as 1 μ mol of H_2O_2 consumed per minute and the specific activity is reported as units per milligram of protein.

2.6.2. Glutathione peroxidase (GSH-Px)

GSH-Px was measured by the method of Wendel (1981) [28] using *tert*-butyl-hydroperoxide as substrate. The activity was determined monitoring the NADPH disappearance at 340 nm in a medium containing 2 mM glutathione, 0.15 U/ml glutathione reductase, 0.4 mM azide, 0.5 mM *tert*-butyl-hydroperoxide and 0.1 mM NADPH. One GSH-Px unit is defined as 1 μ mol of NADPH consumed per minute and the specific activity is represented as units per mg protein.

2.6.3. Superoxide dismutase (SOD)

SOD activity was determined using the RANSOD kit (Ransox, Antrim, United Kingdom). The method is based on the formation of red formazan from the reaction of 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride and superoxide radical (produced in the incubation medium from the xanthine–xanthine oxidase reaction system), which is assayed spectrophotometrically at 505 nm. The inhibition

of the produced chromogen is proportional to the activity of the SOD present in the sample. A 50% inhibition is defined as one unit of SOD and the specific activity is represented as units per mg protein.

2.7. Protein determination

Protein concentrations were determined by the method of Lowry et al. (1951) [29], using bovine serum albumin as standard.

2.8. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard deviation. The Student's t test for non-paired samples was used to compare results from controls and PKU patients. A P value less than 0.05 was considered significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer.

3. Results

TBA-RS, a parameter of lipid peroxidation, was determined in the plasma of PKU patients. Fig. 1 shows that TBA-RS measurement was significantly increased from 0.7195 to 2.0975 nmol/mg protein (290%) [$t(12)=5.849$, $P<0.05$] in the plasma of PKU patients. These results strongly indicate that lipid peroxidation is stimulated in the PKU.

TAR measurement, which is a measure of the tissue capacity to react with free radicals, was markedly reduced from 2.1030 to 0.9220 nmol/mg protein (56%) [$t(6)=3.341$, $P<0.05$] in the plasma of PKU patients (Fig. 2). These data indicate a deficient capacity to modulate the damage associated with the enhanced production of reactive species in the PKU.

Next, we examined the activities of the antioxidant enzymes CAT, GSH-Px and SOD in erythrocytes (Table 1). A significant decrease from 0.866 to 0.243 mU/mg protein (70%) of erythrocyte GSH-PX activity [$t(6)=44.01$,

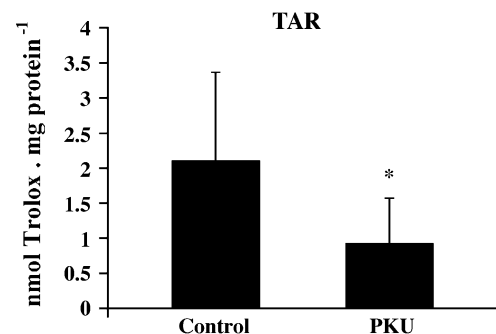


Fig. 2. Plasma total antioxidant reactivity (TAR) from PKU patients and controls. Data represent the mean \pm S.D. ($n=20$). Difference from control, * $P<0.05$ (Student's t test for non-paired samples).

Table 1
Antioxidant enzyme activities in erythrocytes from control and PKU patients

Antioxidant enzyme	Control (n=4)	PKU patient (n=4)
CAT	3.225±0.210	3.48±0.231
GSH-Px	0.866±0.027	0.243±0.087*
SOD	1.265±0.2086	1.215±0.2641

CAT: catalase (pmol/mg prot); GSH-Px: glutathione peroxidase (mU/mg prot); SOD: superoxide dismutase (U/mg prot). Data represent the mean±S.D. One U is defined as 1 µmol of NADPH consumed per minute for GSH-Px and 50% of produced chromogen inhibition for SOD. Difference from control, * $P<0.05$ (non-paired Student's *t* test).

$P<0.05$] (Table 1) was verified in the PKU group compared to the controls. In contrast, the activities of CAT and SOD in PKU patients showed no significant difference from the controls.

4. Discussion

Neurological symptoms and brain abnormalities are characteristic of patients with high Phe plasma levels. However, very little is known about the pathomechanisms involved in the tissue damage of this disorder. In the present study we investigated various parameters of oxidative stress in plasma and erythrocytes from PKU patients.

We demonstrated a significant increase of TBA-RS in the plasma of these patients. Considering that TBA-RS reflects the amount of malondialdehyde formation, an end product of membrane fatty acid peroxidation [30], our data indicate that lipid peroxidation is induced in the plasma of PKU patients, probably secondary to free radical generation.

A significant decrease of TAR measurement was also observed, reflecting a deficient capacity to rapidly handle an increase of reactive species. It should be noted that TAR corresponds to a useful index of the capacity of a given tissue to modulate the damage associated with an increased production of free radicals and reflects the quality of antioxidants (given by its reactivity) [31]. This is in agreement with some studies demonstrating that the total antioxidant status is lower in PKU patients than in control children [19,20]. It was also demonstrated that ubiquinone-10 [10,32] and α -tocopherol [10] are found in lower concentrations in PKU patients. The possible responsible mechanism for this deficiency is a decrease of ubiquinone synthesis secondary to the increase of Phe plasma levels since Phe regulates the mevalonate pathway [1].

In this study, we also verified a decrease of erythrocyte glutathione peroxidase (GSH-Px) activity in the PKU patients. These results probably cannot be explained by the deficiency of selenium which is essential for this enzyme activity since the patients used in the present investigation were not under protein or Phe dietary restricted therapy. In this context, it has been previously reported that GSH-Px

activity is decreased in treated PKU patients and that this activity is well correlated with plasma selenium levels [20]. On the other hand, other investigators found that GSH-Px activity is normal in erythrocytes from PKU patients under selenium supplementation, whereas catalase activity was mildly (8%) reduced and negatively correlated with plasma Phe levels [19]. These differences in antioxidant enzyme activities may possibly be attributed to the distinct samples (non-treated and treated PKU patients) and on the clinical status of the patients utilized in the various studies.

GSH-Px functions as a part of the antioxidant system to protect membranes and essential proteins from the potentially damaging effects of reactive oxygen and lipid peroxides [33,34]. This is very important in erythrocytes given that these cells are by nature highly susceptible to oxidative stress because their membranes are rich in polyunsaturated fatty acids and because the cellular content of oxygen and iron are high [30].

Therefore, taken together our present data showing a significant increase of TBA-RS levels (lipoperoxidation) and a diminution of TAR (capacity to react with free radicals) in plasma and erythrocyte GSH-Px activity, and considering that an unbalance between the total antioxidant defenses and the reactive species formed in the tissues are indicative of oxidative stress [35], it is proposed that free radical generation is involved in the pathophysiology of the tissue damage found in PKU.

Oxidative stress has been demonstrated in animal models of PKU. In this context, it has been observed that experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain [21] and also that lipid peroxidation was significantly increased in the brain, whereas the ratio glutathione/glutathione disulfide was decreased and glucose-6-phosphate dehydrogenase and catalase activities were increased in the erythrocytes of an PKU animal model [22]. In addition, it has been shown that maternal hyperphenylalaninemia induces significant morphological damage in pup rat brain and cerebellum and that the biomolecular oxidative damage was prevented by the antioxidants melatonin, vitamin C and vitamin E [23].

At this point it should be emphasized that the brain has low cerebral antioxidant defenses compared with other tissues [36], a fact that makes this tissue more vulnerable to increased reactive species. There are considerable evidences that oxidative stress is implicated in the pathophysiology of common neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease, multiple sclerosis, as well as in epileptic seizures and demyelination [15,37,38]. Therefore, in case the same results of oxidative stress achieved in plasma from PKU patients also occur in the brain, it may be presumed that oxidative stress also compromises the brain, similar to what occurs in other neurodegenerative disorders.

Our results should, however, be taken with caution and confirmed with a higher number of patients and with other techniques to measure oxidative stress since we used specimens from only a few patients. In this context, CFS

specimens may be useful in certain circumstances to evaluate whether the brain is also a target for reactive species, as for example in non-responsive PKU patients. If the present results are confirmed, we may conclude that oxidative stress contributes at least in part to the severe neurological dysfunction found in PKU. As a perspective of continuation of this work, we propose to study the oxidative stress in treated PKU patients with high and low Phe plasma levels.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from FAPERGS, CNPq and FIPE/HCPA-Brazil.

References

- [1] C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Chapter 77, Hyperphenylalaninurias: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency, 8th ed., McGraw-Hill, Inc., New York, 2001.
- [2] H. Curtis, C. Wiederswieser, G. Viscontini, N. Leimbacher, H. Wegman, H. Schidt, Serotonin and dopamin synthesis in phenylketonuria, *Adv. Exp. Med. Biol.* 133 (1981) 277–291.
- [3] M.C. Aragon, C. Gimenez, F. Valdivieso, Inhibition by L-phenylalanine of tryptophan transport by synaptosomal plasma membrane vesicle, implications in the pathogenesis of phenylketonuria, *J. Neurochem.* 39 (1982) 185–187.
- [4] E. Herrero, M.C. Aragon, C. Gimenez, F. Valdivieso, Inhibition by L-phenylalanine of tryptophan transport by synaptosomal plasma membrane vesicle, implications in the pathogenesis of phenylketonuria, *J. Inherit. Metab. Dis.* 6 (1983) 32–35.
- [5] R. Burri, C. Stefen, S. Stiger, U. Brodbeck, J.P. Colombo, N. Herschkowitz, Reduced myelinogenesis and recovery in hyperphenylalaninemic rats, *Mol. Chem. Neuropathol.* 13 (1990) 57–69.
- [6] J.D. Fernstrom, Dietary amino acids and brain function, *J. Am. Diet. Assoc.* 94 (1994) 71–77.
- [7] A.T.S. Wyse, J.J.F. Sarkis, J.S. Cunha Filho, M.V. Teixeira, M.R. Schetinger, M. Wajner, C.M.D. Wanmacher, Effect of phenylalanine and its metabolites on ATP diphosphohydroxylase activity in synaptosomes from rat cerebral cortex, *Neurochem. Res.* 19 (1994) 1175–1180.
- [8] A.T.S. Wyse, M.E. Noriler, L.F. Borges, P.J. Floriano, C.G. Silva, M. Wajner, C.M.D. Wanmacher, Alanine prevents the decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity in experimental phenylketonuria, *Metab. Brain Dis.* 14 (1999) 95–101.
- [9] P. Burgard, Development of intelligence in early treated phenylketonuria, *Eur. J. Pediatr.* 159 (2000) 74–79.
- [10] C. Colome, R. Artuch, M.A. Vilaseca, C. Sierra, N. Brandi, N. Lambruschini, F.J. Cambra, J. Campistol, Lipophilic antioxidants in patients with phenylketonuria, *Am. J. Clin. Nutr.* 77 (2003) 185–188.
- [11] F.A. Hommes, On the mechanism of permanent brain dysfunction in hyperphenylalaninurias, *Med. Metab. Biol.* 46 (1991) 277–287.
- [12] G.A. Ushakova, H.A. Gubkina, V.A. Kachur, E.A. Lepekhn, Effect of experimental hyperphenylalaninemia on the postnatal rat brain, *Int. J. Dev. Neurosci.* 15 (1997) 29–36.
- [13] S. Missiou-Tsagarakis, K. Soulpi, M. Loumakou, Phenylketonuria in Greece, 12 years experience, *J. Ment. Defic. Res.* 32 (1988) 271–281.
- [14] B. Halliwell, Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity cause or consequence? *Lancet* 344 (1994) 721–724.
- [15] A.Z. Reznick, L. Packer, Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders, in: G. Poli, E. Albano, M.U. Dianzani (Eds.), *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1993, pp. 425–437.
- [16] S. Przedborski, D.B.S. Donaldson, M. Jakowec, J.S. Kish, M. Guttman, G. Rosoklija, A.P. Hays, Brain superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in amyotrophic lateral sclerosis, *Ann. Neurol.* 39 (1996) 158–165.
- [17] E. Bem-Menachem, R. Kyllerman, S. Markleind, Superoxide dismutase and glutathione peroxidase function in progressive myoclonus epilepsies, *Epilepsy Res.* 40 (2000) 33–39.
- [18] C. Colome, C. Serra, M.A. Vilaseca, Congenital errors of metabolism: cause of oxidative stress? *Med. Clin.* 115 (2000) 111–117.
- [19] R. Artuch, C. Colome, C. Sierra, N. Brandi, N. Lambruschini, J. Campistol, D. Ugarte, M.A. Vilaseca, A longitudinal study of antioxidant status in phenylketonuric patients, *Clin. Biochem.* 37 (2004) 198–203.
- [20] M.M.E. van Bachel, G. Printzen, B. Wermuth, U.N. Wiesmann, Antioxidant and thyroid hormone status in selenium-deficient phenylketonuric and hyperphenylalaninemic patients, *Am. J. Clin. Nutr.* 72 (2000) 976–981.
- [21] M.E.K. Hagen, C.D. Pederzoli, A.M. Sgaravatti, R. Bridi, M. Wajner, C.M.D. Wanmacher, A.T.S. Wyse, C.S. Dutra-Filho, Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain, *Biochim. Biophys. Acta* 1586 (2002) 344–352.
- [22] N. Ercal, N. Aykin-Burns, H. Gurer-Orphan, J.D. McDonald, Oxidative stress in a phenylketonuria animal model, *Free Radic. Biol. Med.* 32 (2002) 906–911.
- [23] F. Martinez-Cruz, D. Pozo, C. Osuna, A. Espinar, C. Marchante, J.M. Guerrero, Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: prevent by melatonin, vitamin E and vitamin C, *J. Neurosci. Res.* 69 (2002) 550–558.
- [24] M.W. McCaman, E. Robins, Fluorimetric method for the determination of phenylalanine in serum, *J. Lab. Clin. Med.* 59 (1962) 885–890.
- [25] H. Esterbauer, K.H. Cheeseman, Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 407–421.
- [26] E. Lissi, C. Pascual, M.D. Del Castillo, Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) thermolysis, *Free Radic. Res. Commun.* 17 (1992) 299–311.
- [27] H. Aebi, in: H.U. Bergmeyer, J. Bergmeyer, M. Grabl (Eds.), *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed., 1983, pp. 273–296.
- [28] A. Wendel, Glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.* 77 (1981) 325–332.
- [29] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A. Lewis-Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [30] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd Edition, Oxford University Press, Oxford, 2001.
- [31] E. Lissi, M. Salim-Hanna, C. Pascual, M.D. Del Castillo, Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements, *Free Radic. Biol. Med.* 18 (1995) 153–158.
- [32] R. Artuch, M.A. Vilaseca, J. Moreno, N. Lambruschini, F.J. Cambra, J. Campistol, Decreased serum ubiquinone-10 concentrations in phenylketonuria, *Am. J. Clin. Nutr.* 70 (1999) 892–895.
- [33] I. Lombeck, F. Jochum, K. Terwolbeck, Selenium status in infants and children with phenylketonuria and in maternal phenylketonuria, *Eur. J. Pediatr.* 155 (1996) 140–144.
- [34] J.B. Schulz, J. Lindenau, J. Seyfried, J. Dichgans, Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 4904–4911.
- [35] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Antioxidant defenses: glutathione metabolism, in: B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford, 2001, 146–161 p.
- [36] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Oxygen radicals and nervous system, *Trends Neurosci.* 8 (1996) 22–26.

- [37] E. Méndez-Álvarez, R. Soto-Otero, A. Hermida-Aeijeiras, A.M. López-Real, J.L. Labandeira-García, Effects of aluminium and zinc on the oxidative stress caused by 6-hydroxydopamine autoxidation: relevance for the pathogenesis of Parkinson's disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1586 (2001) 155–168.
- [38] E. Karelson, N. Bogdanovic, A. Garlind, B. Winblad, K. Zilmer, T. Kullisaar, T. Vihalemm, C. Kairane, M. Zilmer, The cerebrocortical areas in normal brain aging and in the Alzheimer's disease: noticeable difference in the lipid peroxidation level and in antioxidant defense, *Neurochem. Res.* 26 (2001) 353–361.

III.2 CAPÍTULO II – ARTIGO 02

Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients

A. Sitta, A.G.Barschak. M. Deon, T. Terroso, R. Pires, R. Giugliani, C.S. Dutra-Filho,
M. Wajner, C.R.Vargas

Periódico: Metabolic Brain Disease

Status: Publicado

Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients

A. Sitta · A. G. Barschak · M. Deon · T. Terroso ·
R. Pires · R. Giugliani · C. S. Dutra-Filho · M. Wajner ·
C. R. Vargas

Received: 14 February 2006 / Accepted: 17 May 2006 /
Published online: 5 December 2006
© Springer Science+Business Media, Inc. 2006

Abstract Phenylketonuria (PKU) is the most frequent disturbance of amino acid metabolism being caused by severe deficiency of phenylalanine hydroxylase activity. Untreated PKU patients present severe mental retardation whose pathophysiology is not completely established. Despite the low-Phe diet, a considerable number of phenylketonuric patients present a mild to moderate psychomotor delay and decreased cognitive functions. In the present study we evaluated various parameters of oxidative stress namely thiobarbituric acid-reactive species (TBA-RS), total antioxidant reactivity (TAR) and activities of the antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GSH-Px) in two groups of treated PKU patients, one with well controlled and the other with high Phe blood levels in order to investigate whether blood Phe concentrations could be correlated with the extend of oxidative stress. We initially verified a marked increase of TBA-RS, and a decrease of TAR in plasma, as well as a reduction of erythrocyte GSH-Px activity which were similar in both groups of PKU patients, when compared to controls of similar ages. In contrast, CAT and SOD activities were not altered in PKU patients. These results show that oxidative stress occurs in PKU patients and that this pathogenic process is probably not directly correlated to Phe blood levels.

Keywords Phenylketonuria · Dietary treatment · Oxidative stress · Free radical

A. Sitta · A. G. Barschak · M. Deon · T. Terroso · R. Pires · R. Giugliani · M. Wajner · C. R. Vargas (✉)
Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350 CEP,
90.035-903, Porto Alegre, RS, Brasil
e-mail: crvargas@hcpa.ufrgs.br

C. R. Vargas
Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

A. Sitta · A. G. Barschak · M. Deon · C. S. Dutra-Filho · M. Wajner · C. R. Vargas
Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

Introduction

Phenylketonuria (PKU) is the most frequent inherited disorder of amino acid metabolism. PKU is caused by a severe deficiency of hepatic phenylalanine hydroxylase activity resulting in accumulation of L-phenylalanine (Phe) and its metabolites in blood and other tissues. Retarded development and intellectual impairment are the most characteristic clinical features presented by PKU patients (Scriver and Kaufmann, 2001). Many studies have searched for the mechanisms underlying mental retardation from PKU, but no single factor has been identified as being responsible for the central nervous system related- problems in these patients (Ercal *et al.*, 2002).

Treatment of PKU patients consists of phenylalanine intake restriction, which is accomplished by a natural protein restricted diet supplemented with a phenylalanine-free amino acid mixture enriched with some essential micronutrients such as vitamins, minerals, and trace elements (Przyrembel and Bremer, 2000). Dietary treatment prevents severe neurological damage in PKU patients, although mild neuropsychological findings, such as poor school performance, a slight reduction in intelligence quotient, and the presence of tremor may arise, especially when careful dietary compliance is not achieved (Weglage *et al.*, 1995). Therefore, the investigation of the new mechanisms that influence the outcome of neurological development in PKU patients may result in improvement of PKU treatment including specific nutritional or pharmacological needs (Sierra *et al.*, 1998).

Oxidative stress, which is defined as an imbalance between the total antioxidant defenses and the reactive species formed in the tissues (Halliwell and Gutteridge, 2001), is an important event that has been related to the pathogenesis of neurodegenerative disorders, epileptic seizures, demyelination (multiple sclerosis), dementia, and others (Halliwell and Gutteridge, 1985; Reznick and Packer, 1993). This is understandable since the central nervous system is highly sensitive to oxidative stress due to its high oxygen consumption, its high iron and lipid contents, especially polyunsaturated fatty acids, and the low activity of antioxidant defenses (Halliwell, 1996).

Oxidative stress is also commonly observed in some inborn errors of intermediary metabolism (Colome *et al.*, 2000; Wajner *et al.*, 2004). Although the cause of increased oxidative stress in these diseases is not completely understood, it may be due to accumulation of toxic metabolites that lead to excessive production of free radicals. It may also occur that substantial increase in metabolic by-products directly or indirectly deplete the cell antioxidant capacity. Furthermore, restricted diets applied to patients affected by some inborn errors of metabolism may also alter the antioxidant status by selenium deficiency (Artuch *et al.*, 2004; van Backel *et al.*, 2000).

In a recent study we showed that oxidative stress might play a role in PKU pathogenesis, since some parameters of lipid peroxidation and antioxidant status were significantly altered in PKU patients at diagnosis (non-treated phenylketonuric) (Sirtori *et al.*, 2005). The main aim of the present study was to investigate whether the blood concentrations of Phe could be correlated with the level of oxidative stress in blood of treated phenylketonuric patients. Thus, we evaluated various parameters of oxidative stress named thiobarbituric acid-reactive species (TBA-RS) and total antioxidant reactivity (TAR) in plasma, as well as the activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GSH-Px) in erythrocytes from two groups of treated PKU patients: group I with well controlled Phe blood levels (5.2–9.4 mg/dL) and group II with high Phe blood levels (17.3–21.1 mg/dL).

Material and methods

Patients and controls

Fourteen PKU children under treatment were studied. All patients were diagnosed by high plasma Phe blood levels measured by a fluorimetric method (McCaman and Robins, 1962). Patients underwent treatment consisting of natural protein restricted diet supplemented with a phenylalanine-free amino acid mixture enriched with vitamins and minerals (Przyrembel and Bremer, 2000). The patients were divided into two groups. Patients from the group I ($n = 7$) had Phe average blood levels of 6.57 ± 1.03 mg/dL, and age of 8.00 ± 2.89 years. Patients from group II ($n = 7$) had Phe average blood levels of 19.58 ± 1.50 mg/dL, and age of 9.28 ± 3.30 years. In all patients diagnosis was performed after the neonatal period by selective screening for PKU. Control group ($n = 7$) was composed by healthy individuals of similar ages (8.63 ± 2.26 years) and Phe average blood levels of 1.74 ± 0.89 mg/dL.

Reagents and equipments

All chemicals were of PA purity and purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) except for TBA, which was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and the RANSOD and RANSEL kits, which were purchased from Randox (UK). Phenylalanine levels were determined in a spectrofluorometer (Hitachi F-200). TAR was assayed using a beta liquid scintillation spectrometer (Wallac model 1409). TBA-RS and the antioxidant enzyme activities were measured in a double-beam spectrophotometer with temperature control (Hitachi U-2001).

Erythrocyte and plasma preparation

Erythrocytes and plasma were prepared from whole blood samples obtained from fasting individuals (controls and PKU patients) by venous puncture with heparinized vials. Whole blood was centrifuged at $1,000 \times g$, plasma was removed by aspiration and frozen at -80°C until determination. Erythrocytes were washed three times with cold saline solution (0.153 mol/L sodium chloride). Lysates were prepared by the addition of 1 mL of distilled water to 100 μL of washed erythrocytes and frozen at -80°C until determination of the antioxidant enzyme activities.

For antioxidant enzyme activity determination, erythrocytes were frozen and thawed three times, and centrifuged at $13,500 \times g$ for 10 min. The supernatant was diluted in order to contain approximately 0.5 mg/mL of protein.

Determination of phenylalanine levels

Plasma Phe levels were measured spectrofluorometrically based on the method of McCaman and Robins (1962). Phe reacts with ninhydrin in the presence of copper ions to form a highly fluorescent complex, which is proportional to Phe plasma concentration. The results were represented as mg/dL.

Thiobarbituric Acid-Reactive Species (TBA-RS)

Thiobarbituric acid-reactive species (TBA-RS) were determined according to the method described by Esterbauer and Cheeseman (1990). Briefly, 300 μl of 10% trichloroacetic acid

was added to 150 μl of plasma and centrifuged at $1,000 \times g$ for 10 min at 4°C . Three hundred micro liters of the supernatant were transferred to a test tube and incubated with 300 μl 0.67% thiobarbituric acid (7.1% sodium sulfate) at 100°C for 25 min. The mixture was allowed to cool on water for 5 min. The resulting pink stained TBA-RS was determined at 535 nm wavelength in a spectrophotometer. Calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane subjected to the same treatment as that for the supernatants. TBA-RS were calculated as nmol TBARS/mg protein.

Total Antioxidant Reactivity (TAR)

TAR, which represents the quality of the tissue antioxidants, was determined by measuring the luminol chemiluminescence intensity induced by 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) (ABAP) according to the method of Lissi *et al.* (1992). The background chemiluminescence was measured by adding 4 mL of 2 mM ABAP (0.1 M glycine buffer, pH 8.6) into a glass scintillation vial. Fifteen micro liters of luminol (4 mM) was added to each vial and the chemiluminescence was measured. This was considered to be the basal value. Ten micro liters of 10 μM Trolox or plasma were then added and the chemiluminescence was measured during 60 s. The addition of Trolox or supernatant reduces the chemiluminescence. The rapid reduction in luminol intensity is considered the measure of the TAR capacity. TAR measurement was calculated as nmol Trolox/mg protein.

Antioxidant enzyme activities

Catalase Assay (CAT)

CAT enzyme is an antioxidant that catalyses the decomposition of hydrogen peroxide. CAT activity was assayed by the method of Aebi (1984) measuring the absorbance decrease at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H_2O_2 , 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and 0.1–0.3 mg protein/ml. One unit of the enzyme is defined as 1 μmol of H_2O_2 consumed per minute and the specific activity is reported as units per milligram of protein.

Glutathione Peroxidase (GSH-Px)

GSH-Px was measured using the RANSEL kit (Randox, United Kindom). The method is based on Paglia and Valentine (1967). Glutathione peroxidase catalyses the oxidation of glutathione by cumene hydroperoxide. In the presence of glutathione reductase and NADPH, oxidized glutathione is immediately converted to its reduced form with a concomitant oxidation of NADPH to NADP^+ . The decrease in absorbance at 340 nm is measured. One GSH-Px unit is defined as 1 μmol of NADPH consumed per minute and the specific activity is represented as units per mg protein.

Superoxide Dismutase (SOD)

SOD enzyme is an important defense against superoxide ion and catalyses the dismutation reaction of these radical in hydrogen peroxide. SOD activity was determined using the RAN-SOD kit (Randox, United Kingdom). The method is based on the formation of red formazan from the reaction of 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride and superoxide radical (produced in incubation medium from the xanthine–xanthine oxidase

reaction system), which is assayed spectrophotometrically at 505 nm. The inhibition of the produced chromogen is proportional to the activity of the SOD present in the sample. A 50% inhibition is defined as one unit of SOD and the specific activity is represented as units per mg protein.

Protein determination

Erythrocyte protein concentrations were determined by the method of Lowry *et al.* (1951), using bovine serum albumin as standard. Plasmatic protein concentrations were determined by Biuret method using the Labtest kit (Labtest Diagnóstica, MG, Brazil).

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard deviation, and were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan multiple range test when the F value was significant. Correlations of Phe blood levels with TBA-RS or TAR were analyzed using Pearson correlation test. A *P* value lower than 0.05 was considered significant. All analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer.

Results

TBA-RS, a parameter of lipid peroxidation, was determined in plasma of the two groups of treated PKU patients. As shown in Figure 1, TBA-RS measurement was significantly increased in both groups of treated PKU patients when compared to the control group [$F(2,18) = 17.85, P < 0.01$]. However, TBA-RS measurement is not significantly different between the two studied groups of PKU patients. No correlation was observed between Phe blood levels and TBA-RS in both groups of treated PKU patients ($r = 0.146, P > 0.05$).

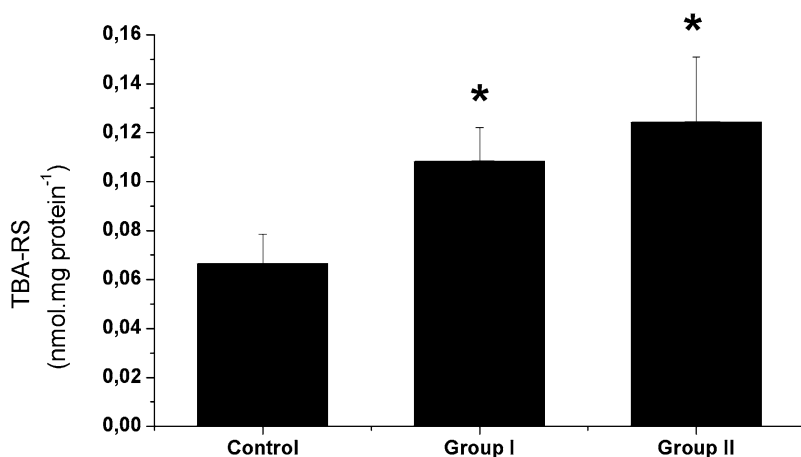


Fig. 1 Plasma thiobarbituric-acid species (TBA-RS) in two groups of treated PKU patients. Group I represent PKU patients with Phe average blood levels of 6.57 ± 1.03 mg/dL. Group II represent patients with Phe average blood levels of 19.58 ± 1.50 mg/dL. Data represent the mean \pm SD ($n = 7$). Difference from control, * $P < 0.01$ (ANOVA)

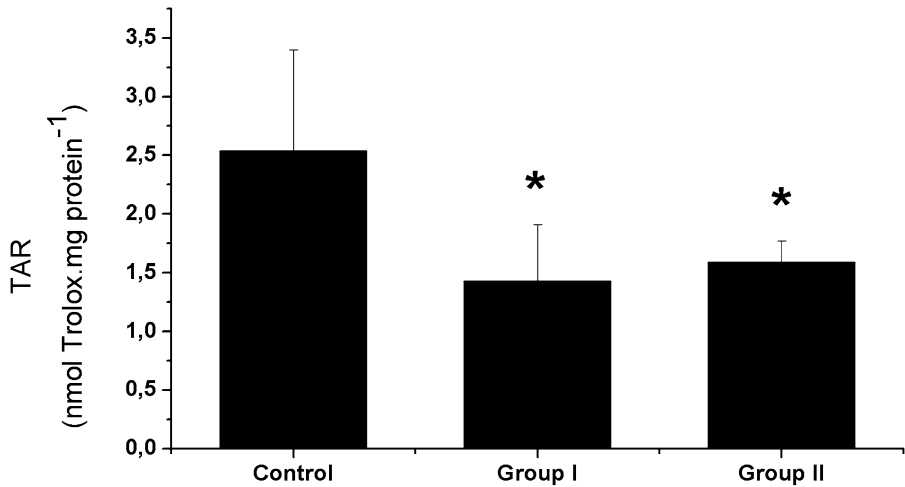


Fig. 2 Plasma total antioxidant reactivity (TAR) of two groups of treated PKU patients. Group I represent PKU patients with Phe average blood levels of 6.57 ± 1.03 mg/dL. Group II represent PKU patients with Phe average blood levels of 19.58 ± 1.50 mg/dL. Data represent the mean \pm SD ($n = 7$). Difference from control, * $P < 0.01$ (ANOVA)

These results indicate that lipid peroxidation is increased in PKU patients, even when Phe levels are under control.

Figure 2 shows that plasma TAR determination, which is a measure of the tissue capacity to react with free radicals, was markedly reduced in both groups of treated PKU patients when compared to the control group [$F(2,18) = 7.57$, $P < 0.01$]. Furthermore, there was no significant difference between the two groups of patients studied. No significant correlation was observed between Phe blood levels and TAR measurement in these patients ($r = 0.039$, $P > 0.05$). These data indicate that PKU treated patients remain with a deficient capacity of modulating the damage associated to the enhanced production of reactive species in PKU, regardless of Phe levels.

The activities of the antioxidant enzymes CAT, SOD and GSH-Px were then determined in erythrocytes of treated PKU patients (Table 1). The activities of CAT and SOD in both groups of treated PKU patients showed no significant difference from the controls. In contrast, GSH-Px activity was significantly reduced in both groups of treated PKU patients when compared to control group [$F(2,18) = 18.26$, $P < 0.01$]. No significant correlation

Table 1 Antioxidant enzyme activities in erythrocytes from control and two groups of treated PKU patients

Antioxidant enzyme	Control ($n = 7$)	PKU patients Group I ($n = 7$)	PKU patients Group II ($n = 7$)
CAT	5.243 ± 1.637	4.974 ± 2.008	5.890 ± 1.890
GSH-Px	0.505 ± 0.060	$0.318 \pm 0.040^*$	$0.348 \pm 0.079^*$
SOD	4.314 ± 1.221	4.486 ± 1.742	3.771 ± 1.114

Note. Group I = patients with Phe average blood levels of 6.57 ± 1.03 mg/dL. Group II = patients with Phe average blood levels of 19.58 ± 1.50 mg/dL. CAT: catalase (pmol/mg protein); GSH-Px: glutathione peroxidase (mU/mg protein); SOD: superoxide dismutase (U/mg protein). Data represent the mean \pm SD. One U is defined as $1 \mu\text{mol}$ of NADPH consumed per minute for GSH-Px and 50% of produced chromogen inhibition for SOD. Difference from control, * $P < 0.01$ (ANOVA).

was observed between Phe blood levels and GSH-Px activity in these patients ($r = 0.069$, $P > 0.05$).

Discussion

Phenylketonuria is one of the most common inborn errors of metabolism, presenting a prevalence of about 1:10 000 newborn. Severe mental retardation and epilepsy, which are the hallmark of untreated phenylketonuric patients, are almost completely prevented when patients are submitted to a poor phenylalanine diet (Hendriksz and Walter, 2004).

Various mechanisms have been proposed as being involved in the pathogenesis of the neurological damage in PKU such as impairment of neurotransmitter biosynthesis (Hanley *et al.*, 2000), reduction of Na^+ , K^+ -ATPase activity (Wyse *et al.*, 1994), reduction of myelin biosynthesis, synapse formation, and dendritic arborization (Bauman and Kemper, 1982), down-regulation of the mevalonate pathway with concomitant reduction of cholesterologenesis (Shefer *et al.*, 2000), and increased oxidative stress in selenium deficient PKU and hyperphenylalaninemic patients (van Backel *et al.*, 2000).

Early treatment based on Phe restrict diet prevents accumulation of abnormal metabolites, enabling children with PKU to develop normally (Burgard, 2000). However, the long-term administration of a diet composed by amino acids mixtures instead of natural proteins results in certain specific deficiencies (Longhi *et al.*, 1987).

Oxidative stress was observed in some inborn errors of intermediary metabolism due to accumulation of toxic metabolites, leading to excessive free radical production (Colome *et al.*, 2000). Furthermore, oxidative stress has also been demonstrated in animal models of hyperphenylalaninemia and PKU (Hagen *et al.*, 2002; Ercal *et al.*, 2002; Martinez-Cruz *et al.*, 2002). In addition, antioxidant status was also evaluated in PKU patients treated with low-Phe diet (Schulpis *et al.*, 2003, 2005). Besides, some studies also showed that there is deficiency in selenium (Se) levels in treated PKU patients (Rottoli *et al.*, 1985; Darling *et al.*, 1992). Another study reported a significant decrease of glutathione peroxidase (GSH-Px) activity in PKU and mild hyperphenylalaninemia patients, even though their selenium levels were normalized by Se supplementation (Sierra *et al.*, 1998).

In a recent study from our laboratory we evaluated various parameters of oxidative stress in PKU patients at diagnosis (non treated patients), and demonstrated the significant increase in TBA-RS and a significant decrease in TAR measurements in plasma, as well as a significant decrease in GSH-Px activity in erythrocytes of these patients, suggesting that oxidative stress is involved in this disease (Sirtori *et al.*, 2005).

In the present study, we measure various oxidative stress parameters in plasma and erythrocytes from two groups of treated PKU patients, one with a good response to dietary treatment and the other with high Phe levels.

We demonstrated a significant increase of TBA-RS in both groups of treated PKU patients (group I and group II) when compared to the control group. Furthermore, no difference of TBA-RS measurement could be detected between the two groups studied, indicating that there is no relationship between lipid peroxidation and Phe blood levels in treated PKU patients. Since TBA-RS reflects the amount of malondialdehyde formation, an end product of membrane fatty acid peroxidation (Halliwell and Whiteman, 2004), these data suggest that lipid peroxidation is increased in PKU patients despite the special dietary treatment that these patients undertake.

We also observed a decrease of TAR measurement in both groups of treated PKU patients. Since TAR corresponds to a useful index of the capacity of a given tissue to modulate the

damage associate to an increased production of free radicals and reflects the quality of antioxidants (given by its reactivity) (Lissi *et al.*, 1995), it is concluded that low-Phe diet treatment is not able to improve the capacity of rapidly handling an increase of reactive species in PKU patients. TAR measurement was equally decreased in both groups of PKU patients studied, regardless of Phe blood levels indicating that there is not a relationship between antioxidant reactivity and Phe plasma levels in PKU. However, other causes for the increased oxidative stress, such as selenium and antioxidant vitamin deficit may prevail in these patients.

Glutathione peroxidase (GSH-Px) functions as a part of the antioxidant system that protects membranes and essential proteins from the potentially damaging effects of reactive oxygen and lipid peroxides (Lombek *et al.*, 1996; Schulz *et al.*, 2000). In this study we verified a decrease of erythrocyte GSH-Px activity in both groups of treated PKU patients. Furthermore, the GSH-Px activity was not different between both groups of treated PKU patients, indicating that Phe blood levels were not related to erythrocyte glutathione peroxidase activity in these patients. In this context, it has been reported that GSH-Px activity is decreased in treated PKU patients and that this activity is well correlated to plasma selenium levels (van Backel *et al.*, 2000). We did not measure plasma selenium levels in our patients, so that we cannot discard the possibility that our results were caused by the deficiency of selenium, which is essential for this enzyme activity since the patients included in the present investigation were under protein dietary restriction therapy. However, since in our previous study we demonstrated a decrease in GSH-Px activity in PKU patients at diagnosis when they were not under protein restricted diet (Sirtori *et al.*, 2005), other causes for the decreased activity may be searched for.

In conclusion, the present study reinforces the hypothesis that oxidative stress is induced in PKU and that this pathogenic process also occurs in PKU patients under protein dietary restriction therapy. Furthermore, our results indicate that oxidative stress in PKU may not be directly related to Phe blood levels. However, such results must be taken with caution, since our experiments were conducted with samples collected at a single time point during treatment. Therefore, these samples might not represent patients' metabolic control as a whole.

In order to better elucidate the lack of correlation between Phe blood levels and oxidative stress, further experiments using a considerable number of samples throughout treatment are necessary. Also it seems desirable to associate the various parameters of oxidative stress with the other accumulating metabolites of PKU in order to better understand its pathophysiology.

Acknowledgements This work was supported in part by grants from FAPERGS, CNPq and FIPE/HCPA-Brazil.

References

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126
- Artuch R, Colome C, Sierra C, Brandi N, Lambruschini N, Campistol J, Ugarte D, Vilaseca MA (2004) A longitudinal study of antioxidant status in phenylketonuric patients. *Clin Biochem* 37:198–203
- Bauman ML, Kemper TL (1982) Morphologic and histoanatomic observations of the brain in untreated human phenylketonuria. *Acta Neuropathol* 58:55–63
- Burgard P (2000) Development of intelligence in early treated phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 159:74–79
- Colome C, Sierra C, Vilaseca MA (2000) Congenital errors of metabolism: cause of oxidative stress? *Med Clin* 115:111–117

- Darling G, Mathias P, O'Regan M, Naughten E (1992) Serum selenium levels in individuals on PKU diets. *J Inherit Metab Dis* 15:769–773
- Ercal N, Aykin-Burns N, Gurer-Orhan H, McDonald JD (2002) Oxidative stress in a phenylketonuria animal model. *Free Rad Biol Med* 32:906–911
- Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth Enzymol* 186:407–421
- Hagen MEK, Pederzoli CD, Sgaravatti AM, Bridi R, Wajner M, Wanmacher CMD, Wyse ATS, Dutra-Filho CS (2002) Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. *Biochim Biophys Acta* 1586:344–352
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1985) Oxygen radicals and nervous system. *Trends Neurosci* 8:22–26
- Halliwell B (1996) Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem Soc Trans* 24:1023–1027
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2001) Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death. In: Halliwell B, Gutteridge JMC (eds) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford, pp 246–350
- Halliwell B, Whiteman M (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142:231–255
- Hanley WB, Lee AW, Hanley AJG, Lehotay DC, Austin VJ, Schoonheydt WE, Platt BA, Clarke JTR (2000) Hypotyrosinemia in phenylketonuria. *Mol Gen Metab* 69:286–394
- Hendriksz CJ, Walter JH (2004) Update on phenylketonuria. *Curr Paediatr* 14:400–406
- Lissi E, Pascual C, Del Castillo MD (1992) Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis-(amidinopropane) thermolysis. *Free Rad Res Commun* 17:299–311
- Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, Del Castillo MD (1995). Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Rad Biol Med* 18:153–158
- Lombek I, Jochum F, Terwolbeck K (1996) Selenium status in infants and children with phenylketonuria and in maternal phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 155:140–144
- Longhi R, Rottoli A, Vittorelli A, Zecchini G, Bonabitacola T, Bertassi F, Riva E, Giovannini M (1987) Trace elements nutrition in hyperphenylalaninemic patients: Long-term follow up study. *Eur J Pediatr* 146:32–37
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis-Farr A, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Martinez-Cruz F, Pozo D, Osuna C, Espinar A, Marchante C, Guerrero JM (2002) Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: prevent by melatonin, vitamin E and vitamin C. *J Neurosci Res* 69:550–558
- McCaman MW, Robins E (1962) Fluorimetric method for the determination of phenylalanine in serum. *J Lab Clin Med* 59:885–890
- Paglia DE, Valentine WN (1967) Glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70:158
- Przyrembel H, Bremer HJ (2000) Nutrition, physical growth, and bone density in treated phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 159:129–135
- Reznick AZ, Packer L (1993) Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. In: Poli G, Albano E, Dianzani MU (eds) *Free radicals: From basic science to medicine*. Birkhauser, Basel, pp 425–437
- Rottoli A, Lista G, Zecchini G, Butté C, Longhi R (1985) Plasma selenium levels in treated phenylketonuric patients. *J Inherit Metab Dis* 8:127–128
- Schulpis KH, Tsakiris S, Karikas GA, Moukas M, Behrakis P (2003) Effect of diet on plasma total antioxidant status in phenylketonuric patients. *Eur J Clin Nutr* 57:282–287
- Schulpis KH, Tsakiris S, Traeger-Synodinos J, Papassotiriou I (2005) Low total antioxidant status is implicated with high 8-hydroxy-2-deoxyguanosine serum concentrations in phenylketonuria. *Clin Biochem* 38:239–242
- Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J (2000) Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 267:4904–4911
- Scriver CR, Kaufmann S (2001) The hyperphenylalaninemias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, 8th edn. McGraw-Hill, New York, pp 1667–1724
- Shefer S, Tint GS, Jean-Guillaume D, Daikhin E, Kendler A, Nguyen LB, Yudkoff M, Charissa A, Dyer CA (2000) Is there a relationship between 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase activity and forebrain pathology in the PKU mouse? *J Neurosci Res* 61:549–563
- Sierra C, Vilaseca MA, Moyano D, Brandi N, Campistol J, Lambruschini N, Cambra FJ, Deulofeu R, Mira A (1998) Antioxidant status in hyperphenylalaninemia. *Clin Chim Acta* 276:1–9

- Sirtori LR, Dutra-Filho CS, Fitarelli D, Sitta A, Haeser A, Barschak AG, Wajner M, Coelho DM, Llesuy S, Belló-Klein A, Giugliani R, Deon M, Vargas CR (2005) Oxidative stress in patients with phenylketonuria. *Biochim Biophys Acta* 1740:68–73
- van Backel MM, Printzen G, Wermuth B, Wiesmann UN (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 AT, Dutra-Filho CS (2004) The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J Inherit Metab Dis* 27:427–448
- Weglage J, Pietsch M, Funders B, Koch HG, Ullrich K (1995) Neurological findings in early treated phenylketonuria. *Acta Paediatr* 84:411–415
- Wyse ATS, Sarkis JJ, Cunha-Filho JS, Teixeira MV, Schetinger MR, Wajner M, Milton C, Wannmacher C (1994) Effect of phenylalanine and its metabolites on ATP diphosphohydrolase activity in synaptosomes from rat cerebral cortex. *Neurochem Res* 19:1175–1180

IV. DISCUSSÃO

A fenilcetonúria é um erro inato do metabolismo, causado pela deficiência grave da fenilalanina hidroxilase hepática (PAH), enzima que catalisa a conversão da fenilalanina em tirosina. Essa doença é bioquimicamente caracterizada pelo acúmulo da fenilalanina e de seus metabólitos tóxicos no sangue e outros tecidos. Dependendo da atividade residual da enzima PAH, os níveis de Phe no sangue dos pacientes fenilcetonúricos sob uma dieta normal podem atingir concentrações de até 2,4mM, enquanto os valores de Phe livre no plasma de crianças normais são de $62 \pm 18 \mu\text{M}$ (Scriver et al, 2001).

As elevações dos níveis sanguíneos de fenilalanina estão associadas ao agravamento da disfunção neurológica característica nos pacientes fenilcetonúricos. Muitos estudos 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 PAH, mas a hiperfenilalaninemia e/ou o acúmulo dos metabólitos (PPA, PL e PA), que causam os danos cerebrais. Embora os pacientes fenilcetonúricos apresentem um padrão característico de disfunção neurológica, os mecanismos patogênicos responsáveis pelas alterações neurológicas ainda não estão bem definidos.

Nesse sentido, diversos estudos vêm sendo conduzidos visando elucidar a fisiopatologia da PKU. Alguns estudos sugerem que concentrações elevadas de fenilalanina e/ou de seus metabólitos exerceriam uma toxicidade direta no sistema nervoso central (SNC), já que a diminuição das concentrações de fenilalanina

através da instauração do tratamento dietético tem conseguido melhorar o quadro neurológico grave apresentado por pacientes fenilcetonúricos não tratados (Campistol et al, 2001; Surtees e Blau, 2000). Adicionalmente, concentrações elevadas de Phe parecem influenciar diversos mecanismos cerebrais como a excitabilidade neural, a condução axonal e a velocidade na transmissão sináptica (Burri et al, 1990; Fernstrom, 1994). Também foi demonstrado que a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase está reduzida na membrana sináptica em modelos animais de PKU (Wyse et al, 1994).

Diferentes aminoácidos neutros, como fenilalanina, valina, leucina, isoleucina, treonina, histidina, triptofano, metionina e tirosina, utilizam o mesmo sistema de transporte através da barreira hematoencefálica (BHE). Portanto, o excesso de Phe na PKU aumenta a competição pelo transportador e diminui a passagem dos demais aminoácidos neutros pela BHE. Como conseqüência, pode-se observar um déficit destes aminoácidos no líquido cefalorraquidiano. Estudos têm demonstrado que esse déficit pode ocasionar diferentes alterações metabólicas e manifestações clínicas, que podem contribuir para a patogenia da PKU. Em primeiro lugar, o triptofano e a tirosina são precursores dos neurotransmissores serotonina e dopamina, respectivamente. Portanto, a deficiência desses aminoácidos no SNC pode provocar uma diminuição na síntese dos metabólitos das vias dopaminérgica e serotoninérgica, e causar uma alteração na neurotransmissão (Surtees e Blau, 2000; Pardridge, 1998; Burlina et al, 2000). Além disso, os desequilíbrios plasmáticos e intracelulares dos aminoácidos neutros, como conseqüência da limitação de sua passagem através da BHE, provocam a redução de suas concentrações no SNC e, portanto, a formação de proteínas anômalas, o que se tem relacionado com uma

proliferação dendrítica e uma mielinização defeituosa na PKU (Campistol et al, 2001; Surtees e Blau, 2000).

O cérebro possui níveis relativamente baixos de enzimas antioxidantes e um conteúdo lipídico relativamente alto com grandes quantidades de ácidos graxos insaturados e catecolaminas, os quais são substratos suscetíveis ao ataque de espécies reativas. O envolvimento de radicais livres e do estresse oxidativo na fisiopatologia de várias doenças que comprometem o sistema nervoso central vem sendo cada vez mais comprovado (Halliwell e Gutteridge, 2001; Carney et al, 1992).

Nos últimos anos, estudos realizados em modelos animais e também em pacientes vêm demonstrando que o estresse oxidativo pode contribuir, pelo menos em um certo nível, com a fisiopatologia do dano neurológico encontrado em diferentes aminoacidopatias. Wyse e colaboradores (2002) verificaram que a hiperhomocisteinemia aguda promove a inibição da catalase e diminui as defesas antioxidantes não-enzimáticas em hipocampo de ratos. Fontella e colaboradores (2002) e Bridi e colaboradores (2003, 2005b) mostraram que os aminoácidos ramificados e seus respectivos α -cetoácidos, excretados na Doença da Urina do Xarope do Bordo (MSUD), estimulam a lipoperoxidação *in vitro* e reduzem as defesas antioxidantes em homogeneizados de cérebro de ratos jovens. O mesmo resultado foi encontrado por Barschak e colaboradores (2006) em plasma de pacientes com MSUD. Além disso, a observação de que a administração de maleilacetoacetato e fumarilacetoacetato, dois metabólitos tóxicos formados na tirosinemia tipo I, podem depletar a glutatona, um importante antioxidante intracelular, sugere que os radicais livres estejam envolvidos nesta doença (Bird, 1995).

Nesse contexto, recentes publicações têm sugerido que o estresse oxidativo está implicado na patogenia da PKU. Hagen e colaboradores (2002) mostraram que a quimiluminescência, um parâmetro de lipoperoxidação, está aumentada enquanto o potencial antioxidante total está reduzido no cérebro de ratos hiperfenilalaninêmicos e que a atividade da CAT foi inibida pela Phe *in vitro* e *in vivo*.

Além disso, van Bakel e colaboradores (2000) encontraram uma diminuição dos níveis de selênio séricos, além da diminuição do *status* antioxidante total (TAS) em pacientes com fenilcetonúria clássica e também com HPA persistente benigna tratados. Por sua vez, Artuch e colaboradores (2004) verificaram que os níveis de selênio em pacientes com PKU tratados não diferiram do grupo controle, enquanto a ubiquinona-10 (Q-10), outro antioxidante, estava reduzida nos pacientes. Complementando esse estudo, Colomé e colaboradores (2003) concluíram que a diminuição nas concentrações de Q-10 pode estar associada ao consumo excessivo de tocoferol ou às elevadas concentrações de malondialdeído encontradas em pacientes fenilcetonúricos sob tratamento.

Assim, levando-se em consideração os trabalhos que sugerem a ocorrência de estresse oxidativo em modelos animais de HPA e também em grupos de pacientes hiperfenilalaninêmicos, o presente trabalho objetivou a investigação de diversos parâmetros de estresse oxidativo em pacientes fenilcetonúricos tratados e não tratados a fim de avaliar se esse processo patológico está relacionado à fisiopatologia do dano tecidual na PKU. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, cujo parecer se encontra no anexo 2.

Em um primeiro momento, analisamos amostras de plasma e eritrócitos de pacientes fenilcetonúricos obtidos no momento do diagnóstico da doença. Cabe salientar que estes pacientes foram diagnosticados tardiamente e não no período neonatal.

Foi verificado um aumento do TBA-RS em amostras de plasma dos pacientes. Considerando que o TBA-RS reflete a quantidade de malondialdeído formado, um produto final da peroxidação de ácidos graxos da membrana (Halliwell e Gutteridge, 2001), este achado sugere que a lipoperoxidação está aumentada em plasma de pacientes fenilcetonúricos ainda não tratados, o que provavelmente ocorre devido a um aumento da geração de radicais livres.

Foi também demonstrado um decréscimo significativo nos níveis de TAR em amostras de plasma de pacientes fenilcetonúricos obtidas no momento do diagnóstico. Deve-se salientar que o TAR corresponde a um índice da capacidade de um determinado tecido em modular o dano associado a uma produção aumentada de radicais livres e reflete não apenas a quantidade de antioxidantes, mas também e, particularmente, a qualidade desses antioxidantes (dada pela sua reatividade) (Lissi et al, 1995).

A determinação da atividade de enzimas antioxidantes também foi realizada em eritrócitos de pacientes portadores de fenilcetonúria obtidos quando do diagnóstico da doença. As atividades das enzimas CAT e SOD não foram significativamente diferentes nos pacientes em relação aos controles, enquanto a enzima GSH-PX apresentou atividade significativamente diminuída nos eritrócitos de pacientes fenilcetonúricos obtidos ao diagnóstico, quando comparado ao grupo controle.

A GSH-Px funciona como parte de um sistema antioxidante que protege membranas e proteínas essenciais dos efeitos potencialmente danosos de espécies reativas e de lipoperóxidos (Schulz et al, 2000). Nos eritrócitos, a ação desse sistema antioxidante é particularmente importante, já que essas células são altamente suscetíveis ao estresse oxidativo por suas membranas serem ricas em ácidos graxos poliinsaturados e pelo seu conteúdo ser rico em oxigênio e ferro (Halliwell e Gutteridge, 2001).

Os resultados encontrados em pacientes fenilcetonúricos ao diagnóstico, ou seja, o aumento na lipoperoxidação, a diminuição da capacidade de reagir aos radicais livres (TAR) e a diminuição da atividade da enzima antioxidante glutationala peroxidase, permitem sugerir que nesses pacientes há uma produção de radicais livres aumentada e uma diminuição das defesas antioxidantes, gerando o processo conhecido como estresse oxidativo.

Dando continuidade a esse trabalho, passamos a investigar o estresse oxidativo em pacientes fenilcetonúricos submetidos ao tratamento dietético preconizado para a doença.

Embora muitas terapias alternativas para o tratamento da PKU venham sendo hoje pesquisadas, tais como a administração oral do cofator BH_4 (Muntau et al, 2002), a terapia enzimática oral com fenilalanina amônia liase (Sarkissian et al, 1999) e até mesmo alguns protocolos de terapia gênica (Eisensmith e Woo, 1996), o controle na ingestão protéica é, ainda hoje, após mais de 50 anos da sua instituição, o principal tratamento preconizado para pacientes portadores de fenilcetonúria.

Quando instituído precocemente, isto é, até o vigésimo dia de vida, o tratamento dietético é capaz de prevenir de maneira eficaz o retardo mental (Santos

et al, 2006). A dieta sempre deve considerar idade, peso, necessidades calóricas, hídricas e protéicas de cada paciente (de Mira e Marquez, 2000). Os objetivos do manejo nutricional devem incluir a manutenção das concentrações plasmáticas de Phe entre 2-5 mg/dL e de Tyr entre 0,58 a 1,95 mg/dL, para propiciar o crescimento e o desenvolvimento normais e para prevenir o catabolismo protéico. Alimentos como carne, grãos e leite e seus derivados são proibidos por possuírem um alto conteúdo de Phe (aproximadamente 300 mg por porção) (Acosta, 2003).

Levando-se em consideração os resultados obtidos na primeira parte deste trabalho, que indicam a participação do estresse oxidativo na PKU, buscamos posteriormente investigar o efeito do tratamento dietético sobre os mesmos parâmetros de estresse oxidativo em pacientes fenilcetonúricos. Para verificar se há uma correlação entre os níveis séricos de Phe e o estresse oxidativo, estudamos dois grupos de pacientes tratados, um grupo que apresentou boa resposta bioquímica ao tratamento dietético (níveis plasmáticos de Phe dentro de valores toleráveis) e outro com níveis plasmáticos de Phe bastante elevados.

A medida de lipoperoxidação TBA-RS mostrou-se igualmente e significativamente aumentada no plasma dos dois grupos de pacientes tratados quando comparada ao grupo controle, indicando que a terapia dietética não impede a ocorrência deste processo, que provavelmente é devida à geração de radicais livres. Além disso, não foi possível observar correlação significativa entre os níveis séricos de Phe e a medida do TBA-RS.

Além disso, a medida da reatividade antioxidante total (TAR) em plasma apresentou-se diminuída em ambos os grupos de pacientes sob tratamento dietético, em comparação aos controles, não havendo também correlação significativa entre a

Phe sérica e este parâmetro de estresse oxidativo. Estes resultados sugerem que o tratamento dietético, mesmo quando bem prescrito e com boa aderência, o que permite manter os níveis séricos de Phe dentro de valores aceitáveis, não garante que haja uma melhora na capacidade do tecido em reagir rapidamente frente a um aumento na geração de espécies reativas.

Também foram avaliadas as defesas antioxidantes enzimáticas em eritrócitos de pacientes fenilcetonúricos submetidos ao tratamento dietético. Assim como ao diagnóstico, as atividades das enzimas CAT e SOD não foram significativamente diferentes dos controles, enquanto a enzima GSH-Px apresentou atividade significativamente diminuída nos dois grupos de pacientes tratados estudados, independentemente dos níveis séricos de Phe.

O sistema antioxidante do organismo é formado por um conjunto de enzimas, substratos, vitaminas e oligoelementos com capacidade para neutralizar o dano oxidativo gerado pela atividade metabólica aeróbia intrínseca. Esse sistema atua de forma sinérgica, de tal modo que é imprescindível uma ação conjunta e equilibrada de todos os seus componentes para conseguir uma máxima eficácia na detoxificação de radicais livres e a regeneração de substâncias antioxidantes. De fato, uma disfunção em algum dos componentes pode resultar em um aumento do estresse oxidativo nos tecidos (Davies, 1995).

Uma vez que muitas das substâncias antioxidantes são provenientes da dieta, os pacientes com PKU, submetidos a restrições dietéticas são um grupo potencialmente suscetível de padecer de deficiências de vitaminas e micronutrientes antioxidantes (Acosta, 1996). Nesse contexto, é importante identificar as deficiências apresentadas pelos pacientes fenilcetonúricos para que sejam corrigidas com

suplementos, já que esses pacientes estão sujeitos a tratamentos dietéticos por toda a vida.

Nesse trabalho, não tivemos a possibilidade de determinar, em nossos pacientes, os níveis de oligoelementos que atuam como antioxidantes. Entretanto, estudos têm demonstrado que dois deles estão normalmente deficientes em pacientes fenilcetonúricos sob tratamento dietético, o que pode contribuir para a ocorrência do estresse oxidativo nessa enfermidade. O primeiro é o selênio, cuja deficiência leva a uma diminuição na atividade da enzima antioxidante glutathione peroxidase (Lombeck et al, 1996). Tem-se demonstrado que a suplementação dietética com selênio pode corrigir essa deficiência, ainda que pacientes com PKU pareçam apresentar uma especial suscetibilidade de carecer desse oligoelemento (Sierra et al, 1998). Outro oligoelemento deficiente em pacientes com PKU é a ubiquinona-10, presente principalmente em carnes. Essa substância é um potente antioxidante lipofílico que desempenha um papel chave na proteção das membranas biológicas frente aos radicais livres e, além disso, tem a capacidade de reciclar outros antioxidantes naturais, como a vitamina E (Artuch et al, 1999; Colomé et al, 2002).

Em conjunto, os resultados encontrados nesse trabalho indicam que o estresse oxidativo é um mecanismo patogênico potencial, podendo contribuir, pelo menos em parte, para a fisiopatologia da PKU.

Os resultados obtidos em amostras de pacientes fenilcetonúricos obtidas no momento do diagnóstico da doença permitem concluir que há um desequilíbrio entre a produção e a degradação de radicais livres nesses pacientes. Esse desequilíbrio

poderia ser explicado, a princípio, pela ação direta da Phe e/ou de seus metabólitos tóxicos, como já havia sido demonstrado em modelos animais (Hagen et al, 2002).

Entretanto, analisando-se os resultados obtidos em dois grupos de pacientes tratados, com diferentes níveis séricos de Phe, onde não se observou correlação significativa entre os diversos parâmetros de estresse oxidativo estudados e as concentrações sanguíneas de Phe, pode-se supor que a Phe não esteja diretamente relacionada com esse processo patológico. Sendo assim, outros fatores, incluindo os outros metabólitos tóxicos acumulados e excretados em altas concentrações na PKU, podem estar envolvidos com o estresse oxidativo. Essas observações, entretanto, devem ser tomadas com cautela já que nossos experimentos foram realizados utilizando-se apenas uma amostra de sangue coletada durante o tratamento, e o nível de Phe encontrado nessa amostra pode não ser representativo do real controle metabólico do paciente.

Com base nos resultados obtidos em pacientes submetidos ao tratamento dietético, pode-se presumir que esse tratamento não tenha ação benéfica sobre o estresse oxidativo. Pelo contrário, é possível que a dieta restrita em proteínas naturais reduza a disponibilidade de micronutrientes e vitaminas que atuem como antioxidantes no organismo. Levando-se em consideração esse resultado, pode-se propor que a administração de antioxidantes e de oligoelementos sabidamente deficientes deva ser considerada como uma terapia adjuvante para pacientes afetados pela PKU.

V. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

a) O parâmetro de lipoperoxidação TBA-RS está significativamente aumentado em amostras de plasma obtidas de pacientes fenilcetonúricos não tratados.

b) A medida da reatividade antioxidante total (TAR) mostrou uma diminuição significativa em plasma de pacientes fenilcetonúricos não tratados.

c) A atividade da enzima antioxidante GSH-Px mostrou-se diminuída em eritrócitos de pacientes fenilcetonúricos no momento do diagnóstico, enquanto as atividades das enzimas CAT e SOD não diferiram do grupo controle.

d) Observou-se um aumento significativo do TBA-RS em plasma de pacientes fenilcetonúricos submetidos ao tratamento dietético em relação aos controles.

e) A medida do TAR foi significativamente diminuída no plasma de pacientes fenilcetonúricos tratados, quando comparado ao grupo controle.

f) Não houve diferença significativa entre as atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT dos pacientes fenilcetonúricos e dos controles. A atividade da enzima GSH-Px, por sua vez, mostrou-se diminuída nos pacientes tratados com relação ao grupo controle.

g) Pacientes fenilcetonúricos tratados apresentam um aumento do TBA-RS e uma diminuição da medida de TAR, indicando que a restrição de proteínas na alimentação não foi capaz de impedir a ocorrência do estresse oxidativo nos pacientes.

h) Não houve correlação significativa entre os níveis de Phe sanguíneos e os diferentes parâmetros de estresse oxidativo avaliados em pacientes fenilcetonúricos.

i) Ainda que outras técnicas de determinação de estresse oxidativo possam ser empregadas para confirmar nossos resultados, podemos concluir que o estresse oxidativo contribui na fisiopatologia da PKU, que esse processo não está diretamente relacionado aos níveis séricos de Phe e que o tratamento dietético parece não exercer um efeito benéfico sobre ele.

VI. PERSPECTIVAS

Pretendemos dar continuidade a esse trabalho, confirmando nossos resultados e expandindo-os. Desta forma, são nossas perspectivas imediatas:

- a) Quantificar os metabólitos tóxicos fenilactato, fenilpiruvato e fenilacetato excretados na PKU, a fim de correlacioná-los aos parâmetros de estresse oxidativo.
- b) Avaliar o efeito do tratamento com suplementação de substâncias antioxidantes sobre os parâmetros de estresse oxidativo em pacientes fenilcetonúricos.
- c) Avaliar os parâmetros de estresse oxidativo em pacientes com diferentes formas clínicas de PKU (hiperfenilalaninemia persistente benigna, hiperfenilalaninemia transitória e deficiência do cofator) separadamente.
- d) Dosar os níveis séricos de selênio em nossos pacientes e, caso se comprove sua deficiência, suplementá-los com esse elemento. Posteriormente, avaliar os parâmetros de estresse oxidativo antes e depois da suplementação com selênio.

- e) Avaliar o estresse oxidativo em pacientes fenilcetonúricos diagnosticados no período neonatal.

VII. REFERÊNCIAS

- Acosta, P.B. (1996). Nutrition studies in treated infants and children with phenylketonuria: vitamins, minerals, trace elements. *Eur J Pediatr* 155:136-139.
- Acosta, P.B. (2003). Nutrition management of patients with phenylketonuria. *Rev Med Minas Gerais* 13(supl 2):129.
- Artuch, R., Vilaseca, M.A., Moreno, J., Lambruschini, N., Cambra, F.J., Campistol, J. (1999). Decreased serum ubiquinone-10 concentration in phenylketonuria. *Am J Clin Nutr* 70:892-895.
- Artuch, R., Colome, C., Sierra, C., Brandi, N., Lambruschini, N., Campistol, J., Ugarte, D., Vilaseca, M.A. (2004). A longitudinal study of antioxidant status in phenylketonuric patients. *Clin Biochem* 37:198-203.
- Barschak, A.G., Sitta, A., Deon, M., Oliveira, M.H., Haeser, A., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., Vargas, C.R. (2006) Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis*, 21(4): 279-286.
- Ben-Menachem, E. Killerman, R., Markleind, S. (2000) Superoxide dismutase and glutathione peroxidase function in progressive myoclonus epilepsies. *Epilepsy Res* 40:29-33.
- Bird, S., Miller, N.J., Collins, J.E., Rice-Evans, A. (1995). Plasma antioxidant capacity in two cases of tirosinaemia type 1: one case treated with NTBC. *J Inher Metab Dis* 18:123-126.
- Bonnefoy, M., Dray, J., Kostka, T. (2002). Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Med* 31(25):1174-1184.

- Boveris, A., Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J* 134:707-716.
- Bridi, R., Araldi, J., Sgarbi, M.B., Testa, C.G., Durigon, K., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S. (2003). Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Int J Dev Neurosci* 21(6):327-332.
- Bridi, R., Latini, A., Braum, C.A., Zorzi, G.K., Wajner, M., Lissi, E., Dutra-Filho, C.S. (2005a). Evaluation of the mechanisms involved in leucine-induced oxidative damage in cerebral cortex of young rats. *Free Radic Res* 39(1):71-79.
- Bridi, R., Braun, C.A., Zorzi, G.K., Wannmacher, C.M., Wajner, M., Lissi, E.G., Dutra-Filho, C.S. (2005b). Alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease stimulate lipid peroxidation and reduce antioxidant defences in cerebral cortex from young rats. *Metab Brain Dis* 20(2):155-167.
- Burlina, A.B., Bonafé, L., Ferrari, V., Suppiej, A., Zacchello, F., Burlina, A.P. (2000). Measurement of neurotransmitter metabolites in the cerebrospinal fluid of phenylketonuric patients under dietary treatment. *J Inherit Metab Dis* 23:313-316.
- Burri, R., Stefen, C., Stiger, S., Brodbeck, U., Colombo, J.P., Herschkowitz, N. (1990) Reduced myelinogenesis and recovery in hyperphenylalaninemic rats. *Mol Chem Neuropathol* 13:57-69.
- Campistol, J., Lambruschini, N., Vilaseca, M.A., Cambra, F.J., Fuste, E., Gómez, L. (2001). Hiperfenilalaninemias. In Sanjunjo, P., Baldellou A. (eds). Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. Madrid: Ergon pp.195-206.

- Carney, J.M., Tatsuno, R.A., Floyd, R.A. (1992). The role of oxygen radicals in ischemic brain damage: free radicals production, protein oxidation and tissue dysfunction. In: Kreigstein, H., Oberpichler-Schwenk, H. *Pharmacology of Cerebral Ischemia*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Clarke, J.T.R. (1996). A clinical guide to inherited metabolic diseases. Cambridge, Cambridge University Press.
- Colomé, C., Artuch, R., Vilaseca, M.A., Sierra, C., Brandi, N., Cambra, F.J., Lambruschini, M., 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., Campistol, J. (2003). Lipophilic antioxidants in patients with phenylketonuria. *Am J Clin Nutr* 77:185–188.
- Cooper, G. (ed). (2000) *The Cell: A Molecular Approach*. 2ª edição. Sunderland: Sinauer Associates.
- Davies, K.J.A. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. In: Rice-Evans, C., Halliwell, B., Lunt, C.G. (eds). *Free radicals and oxidative stress: environment, drugs and foods additives*. London: Portland Press.
- De Mira, N.V.M., Márquez, U.M.L. (2000). Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev Saúde Pública* 34(1):86-96.
- Delanty, M., Dichter, N.A. (1998). Oxidative injury in nervous system. *Acta Neurol Scand* 98:145-153.
- Deon, M., Wajner, M., Sirtori, L.R., Fitarelli, D., Coelho, D., Sitta, A., Barschak, A.G., Ferreira, G.C., Haeser, A., Giugliani, R., Vargas, C.R. (2006). The effect of

- Lorenzo's oil on oxidative stress in X-linked adrenoleukodistrophy. *J Neurol Sci* 247:157-164.
- Eisensmith, R.C., Woo, S.L.C. (1996). Gene therapy for phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 155:16-19.
- Ercal, N., Aykin-Burns, N., Gurer-Orhan, H., McDonald, J.D. (2002). Oxidative stress in a phenylketonuria animal model. *Free Rad Biol Med* 32:906–911.
- Fernstrom, J.D. (1994). Dietary amino acids and brain function. *J Am Diet Assoc* 94:71– 77.
- Fontella, F.U., Pulronik, V., Gasse, E., Wanmacher, C.M.D., Klein, A.B., Wajner, M., Dutra-Filho, C.C. (2000). Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. *Neurochemistry* 11:541-544.
- Fontella, F.U., Gassen, E., Pulronik, V., Wannmacher, C.M.D., Klein, A.B., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S. (2002). Stimulation of lipid peroxidation *in vitro* in rat brain by metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis* 17: 47-54.
- Gimenez-Sanchez, G., Childs, B., Valle, D. (2001). The effect of mendelian disease on human health. Em: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (eds) *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, 8ª edição, New York: McGraw-Hill.
- Giugliani, R., Coelho, J.C. (1997). Diagnóstico de erros inatos do metabolismo na América Latina. *Revista Brasileira de Genética* 20:147-154.
- Hagen, M.E.K., Pederzoli, C.D., Sgaravatti, A.M., Bridi, R.; Wajner, M.; Wanmacher, C.M.D.; Wyse, A.T.S.; Dutra-Filho, C.S. (2002) Experimental

hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. *Biochim Biophys Acta* 1586:344– 352.

Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *The Lancet* 344:721-724.

Halliwell, B; Gutteridge, J.C. (2001). Free Radicals in Biology and Medicine. 3ª edição. New York: Oxford.

Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18:685-716.

Hoffmann, G.F. (1994). Selective screening for inborn errors of metabolism: past, present and future. *Eur J Pediatr* 153:2-8.

Holtzman, N.A., Kronmal, R.A., van Doorninck, W., Azen, C., Koch, R. (1986). Effect of age at loss of dietary control on intellectual performance and behavior of children with phenylketonuria. *New Engl J Med* 314:593-598.

Kolker, S., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., Hoffmann, G.F. (2001). Contribution of reactive oxygen species to 3-hydroxyglutarate neurotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *Pediatr Research* 50:76-82.

Krause, W., Halmisnki, M., McDonald, L., Dembure, P., Salvo, R. (1985). Biochemical and neuropsychological effects of elevated plasma phenylalanine in patients with treated phenylketonuria. A model for the study of phenylalanine and brain function in man. *J Clin Invest* 75:40-48.

Latini, A., Borba Rosa, R., Scussiato, K., Lessuy, S., Bello-Klein, A., Wajner, M. (2002). 3-Hydroxyglutaric acid induces oxidative stress and decreases the antioxidant defences in cerebral cortex of young rats. *Brain Res* 956:367-373.

- Latini, A., Scussiato, K., Borba Rosa, R., Leipnitz, G., Llesuy, S., Bello-Klein, A., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M. (2003a) Induction of oxidative stress by L-2-hydroxyglutaric acid in rat brain. *J Neurosci Res* 74:103-110.
- Latini, A., Scussiato, K., Borba Rosa, R., Llesuy, S., Bello-Klein, A., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M. (2003b) D-2-Hydroxyglutaric acid induces oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *Eur J Neurosci* 17:2017-2022.
- Lehninger, A.L. (2004). Principles of Biochemistry. 4^a edição. New York: Freeman and Company. pp.656-689.
- Lissi, E., Salim-Hanna, M., Pascual, C., Del Castillo, M.D. (1995) Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminal-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Rad Biol Med* 18:153-158.
- Lombeck, I., Jochum, F., Terwolbeck, K. (1996). Selenium status in infant and children with phenylketonuria and in maternal phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 155:140-144.
- Lou, H.C., Güttler, F., Lykkelund, C., Niederwieser, A. (1985). Decreased vigilance and neurotransmitter synthesis after discontinuation of dietary treatment of phenylketonuria in adolescents. *Eur J Pediatr* 144:17-29.
- Lyon, G., Adams, R.D., Kolodny, E.H. (1996). Neurology of hereditary metabolic diseases of children. 2^a edição. New York, McGraw-Hill.
- Marks, D.B., Marks, A.D., Smith, C.M. (1996). Oxygen metabolism and oxygen toxicity. Em: Basic Medical Biochemistry. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Martinez-Cruz, F., Pozo, D., Osuna, C., Espinar, A., Marchante, C., Guerrero, J.M. (2002). Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: prevent by melatonin, vitamin E and vitamin C. *J Neurosci Res* 69:550– 558.

- Marzzoco, A., Torres, B.B. (1990). *Bioquímica Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.
- Matté, C., Monteiro, S.C., Calcagnotto, T., Bavaresco, C.S., Netto, C.A., Wyse, A.T.S. (2004). In vivo and in vitro effects of homocysteine on Na⁺, K⁺-ATPase activity in parietal, prefrontal and cingulate cortex of young rats. *Int J Dev Neurosci* 22:185-190.
- Maxwell, S.R.J. (1995). Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 49:345-361.
- Mönch, E., Herrmann, M.E., Brösicke, H., Schöffner, A., Keller, M. (1996). Utilization of amino acid mixtures in adolescents with phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 155(Suppl) 1:115-120.
- Muntau, A.C., Roschinger, W., Habich, M., Demmelmair, H., Hoffmann, B., Sommerhoff, C.P., Roscher, A.A. (2002) Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. *N Engl J Med* 347:2122-2132.
- Pardridge, W.M. (1998). Blood-brain barrier carrier mediated transport and brain metabolism of amino acids. *Neurochem Res* 23:635-644.
- Prince, A.P., McMurray, M.P., Buist, N.R. (1997) Treatment products and approaches for phenylketonuria: improved palatability and flexibility demonstrate safety, efficacy and acceptance in US clinical trials. *J Inherit Metab Dis.* 20:486-498.
- Przedborski, S., Donaldson, D.B.S., Jakowec, M., Kish, S.J., Guttman, M., Rosoklija, G., Hays, A.P. (1996). Brain superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Annals of Neurology* 39:158-165.

- Przyrembel, H., Bremer, H.J. (2000). Nutrition, physical growth, and bone density in treated phenylketonuria. *Eur J Pediatr*. 159 (Suppl):129-135.
- Reznick, A.Z., Packer, L. (1993). Free radicals and antioxidants in muscular and neurological diseases and Disorders. In: G. Pilo. E. Albano and M.U. Dianzani (eds). *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*. Switzerland: Birkhäuser Verlag Basic.
- Salvador, M., Henriques, J.A.P. (2004). Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. 1ª edição. Canoas: Editora da Ulbra, pp.13-110.
- Santos, L.L., Magalhães, M.C., Januário, J.N., Aguiar, M.J.B., Carvalho, M.R.S. (2006) The time has come: a new scene for PKU treatment. *Genet Mol Res* 5:33-44.
- Sarkissian, C.N., Shao, Z., Blain, F., Peevers, R., Su, H., Heft, R., Chang, T.M and Scriver, C.R. (1999) A different approach to treatment of phenylketonuria: Phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase. *Proc Natl Acad Sci* 96:2339-2344.
- Saudubray, J.M., Charpentier, C. (2001). Clinical phenotypes: diagnosis/algorithms. In: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (eds). *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 8ª edição. New York: McGraw-Hill.
- Schulpis, K.H., Tsakiris, S., Karikas, G.A., Moukas, M. and Behrakis, P. (2003). Effect of diet on plasma total antioxidant status in phenylketonuric patients. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57:282-287.
- 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.

- Schulz, J.B., Lindenau, J., Seyfried, J., Dichgans, J. (2000) Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 267:4904-4911.
- Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. eds. (2001). The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. 8ª edição. New York: McGraw-Hill.
- Scriver, C.R., Kaufman, S., Eisensmith, R.C., Woo, S.L.C. (2001a). Hyperphenylalaninemias. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (eds). The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. 8ª edição. New York: McGraw-Hill.
- Sierra, C., Vilaseca, M.A., Moyano, D., Brandi, N., Campistol, J., Lambruschini, N., Cambra, F.J., Deulofeu, R., Mira A. (1998). Antioxidant status in hyperphenylalaninemia. *Clin. Chim. Acta.* 276:1-9
- Smith, I., Beasley, M.G. and Ades, A.E. (1990). Intelligence and quality of dietary treatment in phenylketonuria. *Arch Dis Child* 65:472-478.
- Smith, I., Lee, P. (2000). The Hyperphenylalaninemias. In: Fernandes, J., Saudubray, J.M., van den Berghe, G. (eds). Inborn Metabolic Diseases. 3ª edição. Springer. pp. 171-179.
- Southorn, P.A., Powis, G. (1988). Free radicals in medicine I. Chemical nature and biological reactions. *Mayo Clin Proc.*63:381-389.
- Streck, E.L., Vieira, P.S., Wanmacher, C.M., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., Wyse, A.T. (2003) *In vitro* effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. *Metab Brain Dis* 18:147-154.
- Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L. (eds). (2002). Biochemistry. 5ª edição. New York: Freeman and Company.

- Surtees, R., Blau, N. (2000). The neurochemistry of phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 159 (Suppl 2):109-113.
- van Bakel, M.M.E., Printzen, G., Wermuth, G., Wiesmann, U.N. (2000). Antioxidant and thyroid hormone status in selenium-deficient phenylketonuric and hyperphenylalaninemic patients. *Am J Clin Nutr* 72:976–981.
- Vargas, C.R., Wajner, M., Sirtori, L.R., Goulart, L., Chiochetta, M., Coelho, D.M., Latini, A., Llesuy, S., Bello-Klein, A., Giugliani, R., Deon, M., Mello, C.F. (2004) Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodistrophy. *Biochim Biophys Acta* 1688:26-32.
- Waber, L. (1990). Inborn errors of metabolism. *Ped Ann* 19(2):105-118.
- Wajner, M., Latini, A., Wyse, A.T., Dutra-Filho, C.S. (2004). The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J Inherit Metab Dis* 27(4):427-48.
- Wulf, D. (2001). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82:47-95.
- Wyse, A.T.S., Sarkis, J.J.F., Cunha Filho, J.S., Teixeira, M.V., Schetinger, M.R., Wajner, M., Wannmacher, C.M.D. (1994). Effect of phenylalanine and its metabolites on ATP diphosphohydrolase activity in synaptosomes from rat cerebral cortex. *Neurochem Res* 19:1175-1180.
- Wyse, A.T.S., Zugno, A.I., Streck, E.L, Matté, C., Calcagnotto, T., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M. (2002). Inhibition of Na⁺, K⁺ - ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. *Neurochem Res* 27:1685-1689.

ANEXO 1 – Lista de figuras

	Pág
Figura 1. Metabolismo da fenilalanina e bloqueio metabólico da enzima.....7 fenilalanina hidroxilase característico da fenilcetonúria	
Figura 2. Rotas alternativas para o catabolismo da fenilalanina na.....8 fenilcetonúria	
Figura 3. Redução do oxigênio à água.....12	

ANEXO 2 – Parecer da comissão científica e comissão de pesquisa e ética em saúde do HCPA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

RESOLUÇÃO

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 04-080

Versão do Projeto: 05/05/2004

Versão do TCLE: 29/06/2004

Pesquisadores:

CARMEN REGLA VARGAS

MOACIR WAJNER

ROBERTO GIUGLIANI

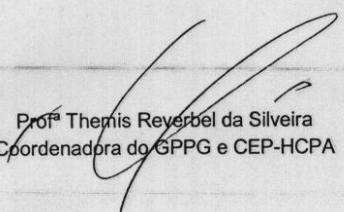
DOUGLAS BONI FITARELLI

FLAVIA VIERO DE ARAÚJO

Título: ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM FENILCETONÚRIA

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

Porto Alegre, 02 de julho de 2004.


Profª Themis Reverbel da Silveira
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA