

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica

*Efeito da administração aguda e crônica de L-tirosina sobre parâmetros
de estresse oxidativo em fígado e em cérebro de ratos jovens*

JULIANA GONZALEZ COELHO

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, 2013.

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

*Efeito da administração aguda e crônica de L-tirosina sobre parâmetros
de estresse oxidativo em fígado e em cérebro de ratos jovens*

JULIANA GONZALEZ COELHO

Orientador: Dr. Carlos Severo Dutra-Filho

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

Porto Alegre, 2013.

Aos meus pais e ao meu marido!

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus por sempre me proteger e iluminar o meu caminho.

Ao meu orientador por toda a paciência, amizade e dedicação que teve comigo durante todos esses anos como IC e agora como mestranda.

Aos meus pais, Coelho e Leila, por todo o amor, confiança, dedicação, por acreditarem em mim e me proporcionarem uma base familiar exemplar. Amo vocês.

Ao meu amado marido, Eduardo, pela amizade, paciência, carinho, por ter trazido a minha vida tanta felicidade e tantas conquistas. Com certeza seu o teu apoio, esse trabalho não seria possível. Te amo!

A minha irmã e melhor amiga, Ise, sem dúvida, por ser a minha irmã e ser a melhor irmã do mundo. Por me incentivar e sempre vibrar comigo a cada nova conquista. Te amo!

A minha prima Bruna, que mora no meu coração, e que foi de grande importância neste trabalho. Conta comigo sempre!

Aos meus avôs, Dinda, meus sogros, cunhados e afilhados, obrigada por estarem sempre presente na minha vida. Amo vocês!

Por último, mas com grande importância, a todos os pós-graduandos e bolsistas do Laboratório 34D. Vocês fazem parte da minha vida e vou sentir muitas saudades. Obrigada a Giovana, Melaine, Carlos, Tarsila, Julia, Raylane, Priscila, Caroline, Andrea, Fernanda e Laila, sem vocês esse trabalho não teria sido possível.

Índice

Parte I	
RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
INTRODUÇÃO	11
1 Erros inatos do metabolismo	11
1.1 Hipertirosinemias	11
1.1.1 Tirosinemia Tipo I	14
1.1.1.1 Características Clínicas	14
1.1.1.2 Diagnóstico	15
1.1.1.3 Dieta e Tratamento	15
1.1.2 Tirosinemia Tipo II	16
1.1.2.1 Características Clínicas	16
1.1.2.2 Diagnóstico	17
1.1.2.3 Dieta e Tratamento	17
2 Radicais Livres	17
2.1 Sistema de Defesa Antioxidante	18
2.2 Estresse Oxidativo	20
2.3 Estresse Oxidativo e Tirosinemia	21
OBJETIVOS	22
Objetivo Geral	22
Objetivos Específicos	22
Parte II	
Capítulo I – Tyrosine administration change parameters of oxidative stress in brain and liver of young rats	24
Capítulo II – Resultados não incluídos em artigos	50
Parte III	
DISCUSSÃO	58
CONCLUSÃO	63
PERSPECTIVAS	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

Parte I

RESUMO

A hipertirosinemia é uma doença autossômica recessiva do catabolismo da tirosina que se caracteriza pelo acúmulo de tirosina nos tecidos, no fluído cérebro-espinhal, no sangue e na urina de pacientes. Em humanos, três tipos foram identificados: tirosinemia tipo I, que é causada pela deficiência da enzima fumarilacetoacetato hidrolase (FAH); a tipo II, pela deficiência da tirosina aminotransferase (TAT) e a tipo III, devido à deficiência da 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (4HPPD). A tirosinemia tipo I tem incidência de 1:200.000 nascimentos e é conhecida por ser a forma mais grave da doença, onde a concentração de tirosina varia de 50 a 120 $\mu\text{mol/L}$. O bloqueio desta enzima (FAH) resulta no acúmulo de metabólitos tóxicos como o maleilacetoacetato (MAA), fumarilacetoacetato (FAA) e succinilacetona (SA), os quais são responsáveis por problemas hepáticos e renais característicos da doença. A tirosinemia tipo II tem incidência de 1:250.000 nascidos vivos e se caracteriza por ter os níveis mais elevados de tirosina (370 a 3420 $\mu\text{mol/L}$). A deficiência da TAT leva a manifestações clínicas como distúrbios oculares, cutâneos e neurológicos. Estudos recentes mostram que o estresse oxidativo pode estar envolvido na fisiopatologia de doenças hereditárias do metabolismo, onde ocorre acúmulo de aminoácidos e ácidos orgânicos, os quais se supõem serem responsáveis pela produção excessiva de espécies reativas. Considerando que os mecanismos das disfunções neurológica e hepática são pouco conhecidos em pacientes hipertirosinêmicos, o presente estudo investigou o possível papel do estresse oxidativo na neuro e hepatotoxicidade da tirosina a fim de melhor compreender os mecanismos de danos observados no cérebro e no fígado desses pacientes. Para isso, o efeito da administração aguda e crônica da L-tirosina foi investigado sob os seguintes parâmetros de estresse oxidativo em cérebro e/ou fígado de ratos jovens: a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD); o conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS); o conteúdo de carbonilas protéicas; o conteúdo de 2'7'diclorofluoresceína formado (DCF). Foi observado que no modelo agudo a L-tirosina diminuiu apenas a atividade da CAT e da SOD, sem alterar os outros parâmetros analisados em fígado de ratos, e que no modelo crônico ela foi capaz de diminuir as defesas antioxidantes enzimáticas, alterar a lipoperoxidação e aumentar a produção de radicais em ambos os tecidos estudados. Esses resultados indicam que a hipertirosinemia é uma situação de risco para a célula e sugerem que o estresse oxidativo possa estar envolvido na fisiopatologia da doença, no entanto, mais estudos precisam ser realizados para melhor esclarecer os mecanismos responsáveis pelas disfunções características da hipertirosinemia.

ABSTRACT

Hypertyrosinemia is an autosomal recessive disease of tyrosine catabolism which is characterized by the accumulation of tyrosine in tissues, cerebrospinal fluid, blood and urine of patients. In humans, three types have been identified: tyrosinemia type I is caused by deficiency of the enzyme fumarylacetoacetate hydrolase (FAH), type II, by deficiency of tyrosine aminotransferase (TAT) and type III, due to the deficiency of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4HPPD). Tyrosinemia type I has an incidence of 1:200,000 newborns and is known for being the gravest form of the disease, where the concentration of tyrosine varies from 50 to 120 $\mu\text{mol/L}$. The blockade of this enzyme (FAH) results in the accumulation of toxic metabolites such as maleylacetoacetate (MAA), fumarylacetoacetate (FAA) and succinylacetone (SA), which are responsible for liver and kidney problems characteristic of the disease. Tyrosinemia type II has an incidence of 1:250,000 newborns and is characterized by having the highest level of tyrosine (370 a 3420 $\mu\text{mol/L}$). The TAT deficiency leads to clinical manifestations such as eye, skin and neurological disturbances. Recent studies have shown that oxidative stress may be involved in the pathophysiology of inherited metabolic disorders where there is an accumulation of amino acids and organic acids, which are supposed to be responsible for the overproduction of reactive species. Whereas the mechanisms of neurological and hepatic dysfunctions are poorly understood in hypertyrosinemic patients, the present study investigated the possible role of oxidative stress in neuro- and hepatotoxicity tyrosine in order to better understand the mechanisms of damage observed in the brain and liver of these patients. For this, the effect of acute and chronic administration of L-tyrosine was investigated under the following oxidative stress parameters in brain and/or liver of young rats: the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD); the content of thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS); the protein carbonyl content; the content of 2'7'diclorofluorescein formed (DCF). It was observed that in the acute model L-tyrosine decreased CAT and SOD activity only, without changing the other parameters analyzed in liver of rats and that in the chronic model it was able to decrease the enzymatic antioxidant defenses, alter lipid peroxidation and increases the radicals production in both analyzed tissues. These results indicate that hypertyrosinemia is a risk to the cell and suggest that oxidative stress may be involved in the pathophysiology of the disease, however, more studies are needed to better clarify the mechanisms responsible for the dysfunction of hipertirosinemia characteristics.

LISTA DE ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$ Oxigênio singlet

4HPPD 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase

CAT Catalase

DCF 2', 7' diclorofluoresceína

DCFH-DA 2', 7' diclorofluoresceína diacetato

EIM Erros inatos do metabolismo

ERO Espécies reativas de oxigênio

FAA Fumarilacetoacetato

FAH Fumarilacetoacetato hidrolase

G6PDH Glicose-6-fosfato desidrogenase

GR Glutathiona redutase

GSH Glutathiona reduzida

GSH-Px Glutathiona peroxidase

GSSG Glutathiona oxidada

H_2O_2 Peróxido de hidrogênio

$\text{HO}\cdot$ Hidroxila

$\text{HO}_2\cdot$ Hidroperoxila

HOCl Ácido hipocloroso

HTI Tirosinemia tipo I

LOOH Peróxidos orgânicos

MAA Maleilacetoacetato

MAI Maleilacetato isomerase

NADPH Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NTBC 2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoil)-1,3-cicloexanodiona

O₂ Oxigênio molecular

O₂⁻ Radical ânion superóxido

O₃ Ozônio

SA Succinilacetona

SNC Sistema Nervoso Central

SOD Superóxido dismutase

TAT Tirosina aminotransferase

TBA-RS Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

INTRODUÇÃO

1 Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são distúrbios hereditários causados pela deficiência parcial ou total de uma proteína, que geralmente tem função de enzima. A síntese defeituosa desta enzima levará a ausência ou deficiência severa na sua atividade, comprometendo a formação do produto e ocasionando acúmulo de substratos tóxicos, ou ainda, originar outros produtos por rotas metabólicas alternativas (Scriver et al., 2001).

Visto que o quadro clínico é bastante diverso devido ao grande número de alterações genéticas, alguns EIM são assintomáticos até a fase adulta, enquanto outros implicam em morte neonatal. Embora isoladamente não apresentem grande incidência, os EIM somados representam aproximadamente 10% das doenças genéticas (Giugliani, 1988).

Os EIM foram classificados em três grupos de acordo com o fenótipo clínico dos pacientes: grupo I, desordens de síntese ou catabolismo de moléculas complexas; grupo II, desordens do metabolismo intermediário, como é o caso da tirosinemia; e grupo III, desordens na produção e utilização energética (Saudubray et al., 2002).

Este trabalho enfoca um EIM do grupo II: a hipertirosinemia, tanto a tipo I quanto a tipo II.

1.1 Hipertirosinemias

A tirosina é um aminoácido aromático que pode ser obtido a partir da hidrólise de proteínas da dieta ou do tecido ou através da hidroxilação da fenilalanina, sendo, portanto, um aminoácido semi-essencial. Ela está diretamente envolvida na biossíntese de catecolaminas, melanina e hormônios da tireoide e, além disso, tem dois destinos

metabólicos principais: síntese proteica ou degradação em fumarato e acetoacetato (Mitchell et al., 2001).

Dentro do citoplasma dos hepatócitos e do epitélio do túbulo proximal do rim, ocorre uma série de reações enzimáticas que são responsáveis pelo metabolismo da tirosina. A deficiência de quatro de cinco dessas enzimas leva à hipertirosinemia, devido ao acúmulo de tirosina nos tecidos, no fluído cérebro-espinhal, no sangue e na urina. Em humanos, diferentes defeitos genéticos associados à rota de metabolização desse aminoácido foram identificados e classificados em três sub-tipos de tirosinemia (tipo I, tipo II e tipo III) e alcaptonúria. A tirosinemia tipo I é causada pela deficiência da enzima fumarilacetoacetato hidrolase (FAH); a tipo II por uma deficiência da tirosina aminotransferase (TAT); a tipo III, uma desordem extremamente rara, devido à deficiência da 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (4HPPD) e a alcaptonúria onde ocorre deficiência da homogentizato 1,2-dioxigenase (Mitchell et al., 2001; Held, 2006) (Figura 1).

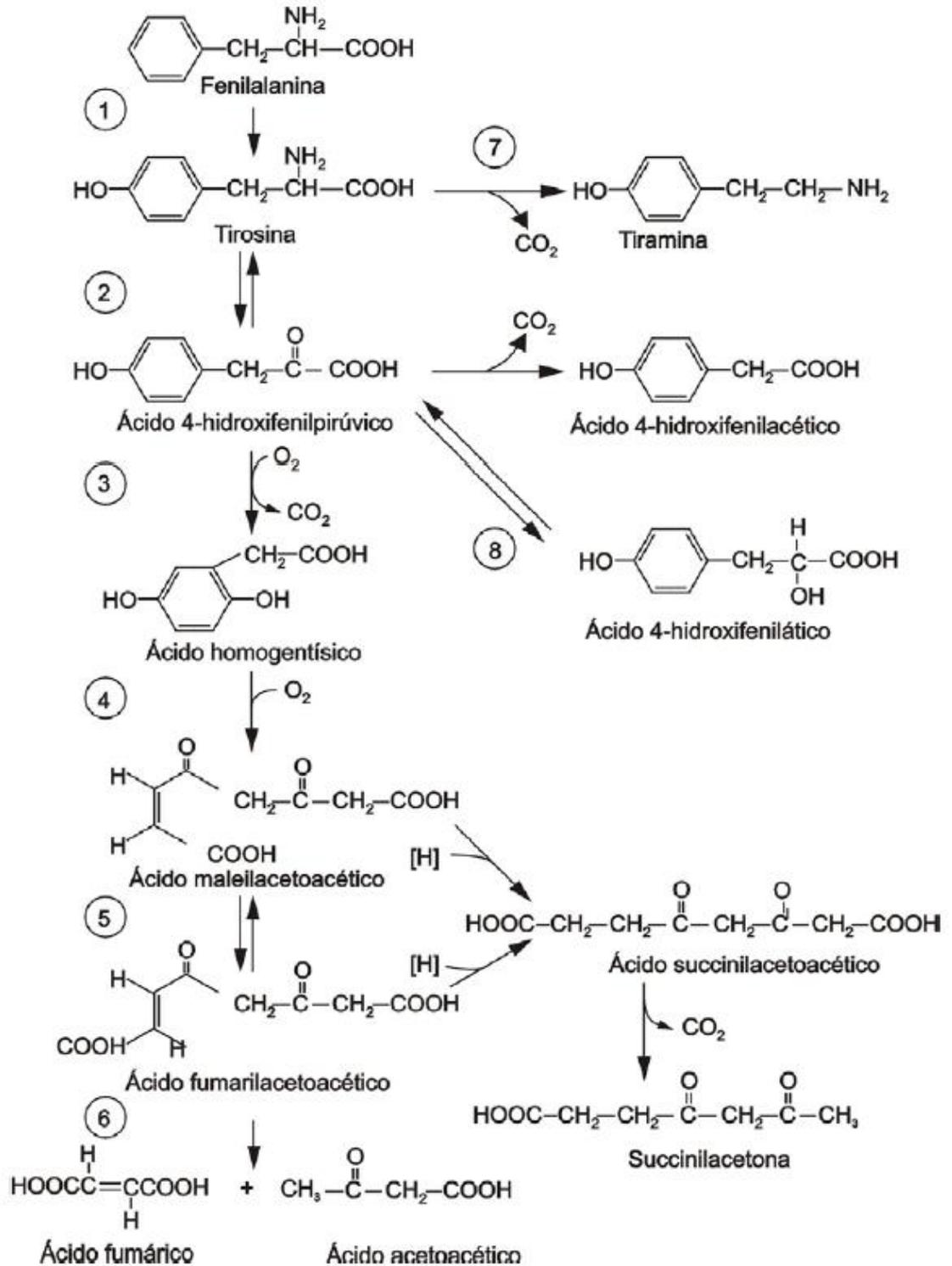


Figura 1: Metabolismo da tirosina. Enzimas: (1) fenilalanina hidroxilase; (2) tirosina aminotransferase (TAT); (3) 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (4HPPD); (5) maleilacetato isomerase (MAI); (6) fumarilacetoacetato hidrolase (FAH). As enzimas (7) e (8) ainda não foram identificadas. Adaptada de Mitchell et al., 2001.

1.1.1 Tirosinemia Tipo I

A tirosinemia tipo I (HTI), também denominada de tirosinemia hepatorenal, é uma doença autossômica recessiva com incidência de 1:100.000 nascidos vivos, conhecida por ser a forma mais grave dentre as tirosinemias. O bloqueio da última enzima da rota metabólica da tirosina, a fumarilacetoacetato hidrolase (FAH), leva ao acúmulo de metabólitos tóxicos como o maleilacetoacetato (MAA), fumarilacetoacetato (FAA) e succinilacetona (SA), os quais são responsáveis por problemas hepáticos e renais característicos da doença (Mitchell et al., 2001; Held, 2006; Masurel-Paulet et al., 2008). Relatos mostram que a concentração de tirosina varia de 50 a 120 $\mu\text{mol/L}$ (normal $< 90 \mu\text{mol/L}$) (Pass e Morrissey, 2008).

1.1.1.1 Características Clínicas

Os problemas hepáticos relatados são: insuficiência hepática, cirrose micronodular e carcinoma hepatocelular, desenvolvido na forma mais avançada da doença. Entre as lesões renais, estão descritas a Síndrome de Fanconi e tubulopatia com raquitismo secundário (Masurel-Paulet et al., 2008). Scott et al., (2006) relata que a fase inicial da doença pode progredir para necrose hepática, icterícia, ascite e hemorragia gastrointestinal. Nos primeiros meses de vida, na forma aguda, os pacientes apresentam problemas no fígado e se não for tratada, leva à morte. Na forma crônica, esses pacientes tem maior problema renal, caracterizado por uma aminoacidúria generalizada, perda de fosfato e acidose renal tubular (Scott et al., 2006). Esses pacientes são geralmente diagnosticados no início da infância com sintomas de hepatomegalia, cirrose hepática, raquitismo hipofosfatêmico ou a combinação desses sintomas e, além disso, podem ter crises neurológicas (Held, 2006).

1.1.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico desses pacientes é feito através da análise de ácidos orgânicos na urina, onde os ácidos 4-hidroxifenilpirúvico, 4-hidroxifenilático e 4-hidroxifenilacético encontram-se aumentados (Endo e Sun, 2002). Há relatos que a urina apresenta um cheiro de “repolho cozido” ou “cogumelo podre”, essa característica associada a uma elevada concentração de uma α -fetoproteína no soro, ajuda na identificação da tirosinemia tipo I. Além disso, ocorre um aumento na concentração de metionina e tirosina no plasma e acúmulo de succinilacetoacetato e succinilacetoacetona na urina e no plasma, sendo esta última considerada o principal indicador para o diagnóstico da doença (Scott et al., 2006; Held, 2006). O teste confirmatório é feito através da medida da enzima FAH em cultura de fibroblastos de pele ou através da análise de mutação de DNA (Scott et al., 2006).

1.1.1.3 Dieta e Tratamento

Os pacientes HTI recebem uma dieta restrita em tirosina e fenilalanina para evitar o acúmulo do metabólito tóxico FAA, porém essa restrição não impede totalmente a disfunção hepática e renal (Langlois et al., 2006; Langlois et al., 2008). Em 1991, a 2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoil)-1,3-cicloexanodiona (NTBC) foi introduzida no tratamento desses pacientes para prevenir esse acúmulo nas células do fígado e do rim. O NTBC bloqueia a enzima 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase, segunda enzima da via metabólica da tirosina, suprimindo o acúmulo dos metabólitos MAA, FAA e SA, mas não impedindo o de tirosina (Lindsedt et al., 1992; Luijterink et al., 2003; Masurel-Paulet et al., 2008). Embora haja uma melhora nos sintomas, essa droga não é capaz de impedir o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (Luijterink et al., 2003; Langlois et al., 2006). Nesses casos, a única terapia efetiva é o transplante de fígado, embora ainda se encontre baixos níveis de SA, que é atribuído a contínua produção renal (Scott

et al., 2006). Essa droga também tem sido testada em ratos knockout-FAH para que não ocorra a morte neonatal, mas 50% dos ratos desenvolveram hepatocarcinoma (Langlois et al., 2006).

1.1.2 Tirosinemia Tipo II

A tirosinemia tipo II, também conhecida como tirosinemia oculocutânea ou síndrome de Richner-Hanhart, é causada pela deficiência autossômica recessiva da enzima hepática tirosina aminotransferase (TAT), sua atividade determina a taxa de degradação da tirosina, pois controla o primeiro passo da rota metabólica desse aminoácido. Tem incidência de 1:250.000 nascidos vivos e se caracteriza por ter os níveis mais elevados de tirosina, em pacientes não tratados varia entre 370 a 3420 $\mu\text{mol/L}$ (normal $< 90 \mu\text{mol/L}$) (Natt et al., 1987; Macsai et al., 2001; Mitchell et al., 2001; Held, 2006).

1.1.2.1 Características Clínicas

A deficiência da TAT leva a manifestações clínicas como, lesões oculares, lesões cutâneas e alterações neurológicas (Mitchell et al., 2001).

As lesões oculares geralmente se manifestam no primeiro ano de vida e caracterizam-se por fotofobia, lacrimejamento, vermelhidão e dor. Além disso, é observado nesses pacientes conjuntivites e ulcerações na córnea, o que pode levar ao glaucoma. Os cristais de tirosina rompem os lisossomos, induzindo a uma resposta inflamatória nos olhos. As lesões cutâneas consistem tipicamente de placas de hiperkeratose nas plantas dos pés e nas palmas das mãos. Em indivíduos mais velhos, hiperkeratose dos cotovelos, joelhos e tornozelos também têm sido relatados. O envolvimento neurológico varia desde um leve decréscimo na inteligência até retardo mental severo associado à microcefalia, automutilação, hiperatividade, distúrbios

motores e no desenvolvimento da fala. Possivelmente, o grau de acometimento do sistema nervoso central esteja relacionado com os altos níveis de tirosina no plasma desses pacientes (Rabinowitz et al., 1995; Goldsmith et al., 1973; Macsai et al., 2001; Mitchell et al., 2001; Held, 2006; Scott et al., 2006).

1.1.2.2 Diagnóstico

O diagnóstico é feito através da determinação da concentração de tirosina na urina e no plasma dos pacientes, assim como os níveis de seus metabólitos na urina. O teste confirmatório é realizado pela avaliação da atividade da TAT em biópsia hepática ou pela análise de mutações no gene da enzima (Mitchell et al., 2001; Held, 2006).

1.1.2.3 Dieta e Tratamento

Pacientes tirosinêmicos tipo II têm demonstrado amenizar as lesões oculares e cutâneas com a restrição dietética de fenilalanina e tirosina. No entanto, as concentrações plasmáticas apropriadas de tirosina para evitar o dano neurológico ainda não foram esclarecidas (Mitchell et al., 2001; Held, 2006).

2 Radicais Livres

O termo radical livre refere-se a qualquer espécie química capaz de ter existência independente e que contém um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica, situação energeticamente instável, conferindo-lhe alta reatividade (Southorn e Powis, 1988; Halliwell e Gutteridge, 2007). Um radical livre pode reagir com um não-radical, assim outro radical livre pode ser formado, desencadeando reações em cadeia de transferência de elétrons (Boveris, 1998).

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, cerca de 95% do oxigênio molecular (O_2) sofre redução tetravalente, resultando na formação de água.

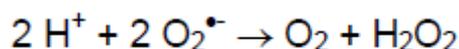
Durante esse processo, intermediários reativos, como os radicais ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila ($HO_2^{\cdot-}$), hidroxila (HO^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são formados em pequenas quantidades na cadeia respiratória mitocondrial (Cohen, 1989). O termo genérico espécies reativas de oxigênio (ERO) refere-se tanto aos radicais livres formados pela redução do O_2 ($O_2^{\cdot-}$ e HO^{\cdot}), quanto aos não-radicaís dele derivados, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlet (1O_2), o ácido hipocloroso (HOCl) e o ozônio (O_3) (Halliwell e Gutteridge, 2007). Essas espécies reativas ocorrem tanto em processos fisiológicos quanto em patológicos do organismo. Quando formadas em excesso, devido a um desequilíbrio entre os sistemas de produção e os de remoção, essas espécies reativas podem promover a lipoperoxidação da bicamada lipídica (com exceção do H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$), oxidar proteínas e DNA, resultando em um processo patológico (Bergendi et al., 1999; Halliwell e Whiteman, 2004).

2.1 Sistema de Defesa Antioxidante

Os seres vivos dispõem de mecanismos protetores para retardar e/ou prevenir o acúmulo de espécies reativas e seus efeitos deletérios. Os sistemas de defesa são classificados em enzimáticos e não-enzimáticos e conservam o equilíbrio entre a produção fisiológica de ERO e sua detoxificação (Halliwell e Gutteridge, 2007; Behl e Moosmann, 2002). As principais enzimas antioxidantes que exercem esse papel são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GSH-Px). Já nas defesas não-enzimáticas incluem os antioxidantes lipofílicos (tocoferóis, carotenóides e bioflavonóides) e hidrofílicos (glutathione, ácido ascórbico, indóis e catecóis) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

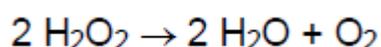
A SOD é uma metaloenzima que catalisa a reação de dismutação do radical ânion superóxido formando peróxido de hidrogênio e oxigênio, assim diminuindo a formação de ERO e ERN deles derivadas. É considerada a defesa primária contra o

estresse oxidativo, já que o radical ânion superóxido é um iniciador de reações em cadeia (Marks, Marks e Smith, 1996). Embora ocorra a remoção do $O_2^{\cdot-}$, o H_2O_2 produzido pela SOD deve ser eliminado por outros sistemas, como a catalase e a glutathiona peroxidase (Fridovich, 1975).



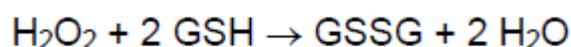
Em células eucarióticas, existem duas formas de SOD: a SOD cobre-zinco (CuZnSOD) encontrada principalmente no citosol e a SOD manganês (MnSOD) presente na matriz mitocondrial (Fridovich, 1995; Ward e Peters, 1995).

Já a CAT é uma heme proteína que catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio, um é reduzido à água e o outro é oxidado a oxigênio.

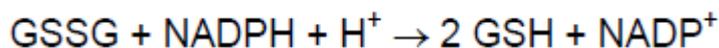


Essa enzima se encontra principalmente nos peroxissomas, que contêm várias enzimas produtoras de H_2O_2 e em menor quantidade no citosol (Chance et al., 1979; Marks, Marks e Smith, 1996). Órgãos como o coração, o músculo esquelético e o cérebro contêm menor quantidade e atividade de CAT que o fígado, tornando-os mais vulneráveis às espécies reativas (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Por fim, a glutathiona peroxidase (GPx) catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos (LOOH) para seus álcoois correspondentes às custas da glutathiona reduzida (GSH), que atua como doadora de elétrons, e é oxidada a glutathiona oxidada (GSSG) (Chance et al., 1979).



A glutathiona redutase (GR) catalisa a redução da GSSG, utilizando NADPH como coenzima, assim dependendo da integridade da via das pentoses fosfatos (Chance et al., 1979; Marks, Marks e Smith, 1996).



2.2 Estresse Oxidativo

Em situações fisiológicas, a produção de espécies ativas de oxigênio e de nitrogênio é balanceada pelos sistemas de defesa de antioxidantes do organismo. O controle entre a produção e a remoção dessas espécies reativas garante a homeostase fisiológica. Porém, quando há um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e as defesas antioxidantes, tem-se a condição de estresse oxidativo (Halliwell, 2001; Behl e Moosmann, 2002).

O aumento das ERO está associado à inadequada oxidação de biomoléculas que leva a um dano celular e ao comprometimento de sua função. Esse dano biomolecular que leva ao estresse oxidativo pode ter como consequências: adaptação celular, geralmente por *up-regulation* das defesas antioxidantes; injúria celular; ou morte da célula por apoptose ou necrose (Behl e Moosmann, 2002; Halliwell e Whiteman, 2004).

O estresse oxidativo parece estar envolvido em diversas doenças ou alterações patológicas que atingem o SNC, incluindo arteriosclerose. Além disso, nosso grupo de pesquisa mostrou que o estresse oxidativo parece estar aumentado em modelos experimentais de alguns EIM, como a hiperargininemia (Wyse et al., 2001), a fenilcetonúria (Kienzle-Hagen et al., 2002), a homocistinúria (Matté et al., 2004) e inclusive, a tirosinemia tipo II (Sgaravatti et al., 2008; Sgaravatti et al., 2009).

O SNC é o mais suscetível a lipoperoxidação quando comparado com outros tecidos, devido ao seu alto consumo de oxigênio, a rica composição de lipídios insaturados, a elevada concentração de ferro e a escassa defesa antioxidante (Halliwell e

Gutteridge, 2007). No entanto, estudos com outros tecidos, como o fígado, também demonstram ser suscetíveis ao ataque de ERO e estarem envolvidos com o estresse oxidativo, como a hiperprolinemia (Ferreira et al., 2012).

2.3 Estresse Oxidativo e Tirosinemia

Estudos recentes mostram que o estresse oxidativo pode estar envolvido na fisiopatologia de doenças do metabolismo, dentre elas, a tirosinemia (Sgaravatti et al., 2008; Sgaravatti et al., 2009), onde ocorre acúmulo de aminoácidos e ácidos orgânicos, os quais se supõem serem responsáveis pela produção excessiva de espécies reativas (Wajner et al., 2004). A administração de FAA e MAA pode diminuir os níveis de glutathiona (GSH), importante antioxidante celular, sugerindo o envolvimento de espécies reativas na HTI (Bird et al., 1995). Além disso, Sgaravatti et al., (2008) mostrou que a incubação de L-tirosina em tecido cerebral alterou diversos parâmetros de estresse oxidativo, como o potencial antioxidante total, conteúdo de tióis e de ácido ascórbico, dano ao DNA e atividade da catalase. E estudos com um modelo agudo de tirosinemia mostraram que o modelo da doença aumentou a lipoperoxidação, o conteúdo de carbonilas protéicas e atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase, e diminuiu o conteúdo de tióis e de GSH no sistema nervoso (Sgaravatti et al., 2009).

Portanto, é importante investigar o possível papel do estresse oxidativo na hepato e neurotoxicidade da tirosina a fim de avaliar sua participação nos mecanismos responsáveis pelas disfunções observadas nos pacientes hipertirosinêmicos, especialmente do tipo I e tipo II, respectivamente.

3 Objetivo Geral

Investigar os efeitos da administração de L-tirosina sobre vários parâmetros de estresse oxidativo em homogeneizados de fígado e cérebro de ratos jovens a fim de melhor compreender os mecanismos responsáveis pelas disfunções hepáticas e neurológicas observados em pacientes hipertiroxinêmicos.

Objetivos Específicos

- 1) Avaliar o efeito agudo de L-tirosina sobre diversos parâmetros de estresse oxidativo, tais como níveis de TBA, conteúdo de carbonilas protéicas, a fluorescência da diclorofluoresceína (DCF) e atividade das enzimas CAT, SOD, GPx e G6PD em fígado de ratos jovens.
- 2) Estudar o efeito da administração crônica de L-tirosina em fígado e cérebro de ratos jovens sobre os seguintes parâmetros de estresse oxidativo: os níveis de TBA, o conteúdo de carbonilas protéicas, a fluorescência da diclorofluoresceína (DCF) e atividade das enzimas CAT, SOD, GPx e G6PD.

Parte II

Hypertyrosinemia alters oxidative stress parameters in brain and liver of young rats

Artigo a ser submetido à revista Metabolic Brain Disease.

Hypertyrosinemia alters oxidative stress parameters in brain and liver of young rats

Juliana Coelho², Giovana Dalazen², Carlos Jacques¹, Melaine Terra², Julia Silva¹,
Raylane Freitas¹, Fernanda Bitencourt¹, Laila Souza¹ e Carlos Severo Dutra-Filho^{1,2*}.

¹Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, RS, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding Author:

Carlos Severo Dutra Filho
Departamento de Bioquímica
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo
90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.
Telephone number: +55 51 33085573
Fax number: +55 51 33085535
E-mail: dutra@ufrgs.br

Abstract

Hypertyrosinemia is an autosomal recessive disease of tyrosine catabolism which is characterized by the accumulation of tyrosine in tissues, brain-spinal fluid, blood and urine of patients. In humans, three different diseases were identified: tyrosinemia type I is caused by deficiency of fumarylacetoacetate hydrolase (FAH); tyrosinemia type II caused by a deficiency of tyrosine aminotransferase (TAT) and tyrosinemia type III due to the deficiency of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4HPPD). Tyrosinemia type I (HTI) leads to the accumulation of toxic metabolites which are considered to be responsible for hepatic and kidney damage, characteristic of the disease. However, tyrosinemia type II presents clinically as ocular lesions, cutaneous lesions and neurological changes. Considering that the role of tyrosine on the mechanisms of neurological and hepatic dysfunctions of the tyrosinemias are poorly known, the present study investigated the possible role of oxidative stress on neuro and hepatotoxicity of hypertyrosinemia in order to better comprehend the possible mechanisms of damage in presented the tyrosinemias. Therefore, the chronic effect of L-tyrosine was investigated on the follow parameters of oxidative stress in brain and liver of young rats: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), tiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) and dichlorofluorescein (DCF). Hypertyrosinemia condition caused decrease in SOD, CAT, GPx and G6PD, and increase in TBA-RS and DCF. Thus, if these effects also occur in humans, it is possible that oxidative stress may contribute for hepatic and neurological dysfunctions characteristic of the hypertyrosinemias.

Keywords: Hypertyrosinemia, Tyrosinemia type I, tyrosinemia type II, oxidative stress

Introduction

Tyrosine is a semi-essential amino acid which can be obtained by hydrolysis of proteins from diet or tissue and by hydroxylation of phenylalanine (Held et al. 2006; Sgaravatti et al. 2009).

Various enzymatic reactions which are responsible for the metabolism of tyrosine occur in the cytoplasm of hepatocytes and epithelium of the proximal tubule of the kidney (Held et al. 2006). The deficiency of some these enzymes produces hypertyrosinemia, due to the accumulation of tyrosine in the tissues, brain-spinal fluid, blood and urine (Scott et al. 2006). In humans, three different autosomal recessive diseases were identified: tyrosinemia type I is caused by deficiency of fumarylacetoacetate hydrolase (FAH); tyrosinemia type II caused by a deficiency of tyrosine aminotransferase (TAT) and tyrosinemia type III, a rare disorder, due to the deficiency of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4HPPD) (Mitchell et al. 2001).

Tyrosinemia type I (HTI), also named hepatorenal tyrosinemia, has an incidence of 1:100.000 births and it is known to be the more severe form of the disease (Mitchell et al. 2001; Held et al. 2006). The blockade of the last enzyme in the metabolic route of tyrosine catabolism, the FAH, leads to the accumulation of toxic metabolites such as maleylacetoacetate (MAA), fumarylacetoacetate (FAA) and succinylacetone (SA), which are considered to be responsible for hepatic and kidney damage, characteristic of the disease (Held et al. 2006; Masurel-Paulet et al. 2008). Reports show that the concentration of tyrosine may reach from 50 to 120 $\mu\text{mol/L}$ (Pass e Morrissey 2008). The hepatic involvement may eventually develop to hepatic insufficiency, cirrhosis micro nodular or carcinoma hepatocellular. While alterations in the renal system may present as Fanconi syndrome and tubulopathy with secondary rickets (Masurel-Paulet et al. 2008).

However, tyrosinemia type II, also known as tyrosinemia oculocutanea or Richner-Hanhart syndrome, has incidence of 1:250.000 born alive infants and characterizes itself for having the highest levels of tyrosine (370 a 3420 $\mu\text{mol/L}$). The deficiency of TAT presents clinically as ocular lesions, cutaneous lesions and neurological changes (Mitchell et al. 2001; Held et al. 2006). The neurological involvement varies from a slight decrease of intelligence to severe mental retardation associated to microcephaly, self-mutilation, hyperactivity, motor disturbances and language deficits (Natt et al. 1987; Macsai et al. 2001; Mitchell et al. 2001; Held, 2006).

Oxidative stress has been studied in several inherited metabolic disorders characterized by the accumulation of amino acids and organic acids, which are supposed to be the responsible for excessive production of reactive species (Wajner et al. 2004). Considering that the role of tyrosine on the mechanisms of the neurological and hepatic dysfunctions of the tyrosinemias are poorly known and that tyrosine altered oxidative stress parameters in rat brain in vitro (Sgaravatti et al. 2008) and by acute administration (single injection) of tyrosine (Sgaravatti et al. 2009), the present study investigated the role of oxidative stress on neuro and hepatotoxicity of hypertyrosinemia in order to better comprehend the possible mechanisms of damage presented in the tyrosinemias. Therefore, the chronic effect of L-tyrosine was investigated on the follow parameters of oxidative stress in brain and liver of young rats: tiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) to measure lipoperoxidation, dichlorofluorescein (DCF) to assess reactive species production, the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) to measure the antioxidants enzymatic defenses, and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) to measure the main production system of NADPH.

Materials and Methods

Reagents and equipments

All chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). A SpectraMax M5/M5 Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA) was used for the measurements. For centrifugation procedures, an Eppendorf 5417R (refrigerated version) and Eppendorf 5403 were used.

Animals

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

Experimental Design

The chronic model of hypertyrosinemia was produced in Wistar rats after the 7th day of life and the animals were divided in two groups. Control group received 0.1% Tween 20 dissolved in saline solution and hypertyrosinemic group received L-tyrosine methyl ester (500 mg / kg body weight) (Sgaravatti et al., 2009). Solutions were prepared each day and were administered by intraperitoneal (ip) twice daily injections for seven days.

Tissue Preparation

Twelve hours after the last injection, animals were anesthetized (85 mg ketamine / Kg body weight and 3 mg xylazine/ Kg body weight, ip) and the liver was perfused with saline solution then, animals were killed by decapitation and the liver and brain were immediately removed. The olfactory bulbs and cerebellum were discarded. Tissues were weighed and homogenized 1:10 w/v in 20 mM sodium phosphate and 140 mM KCl (pH 7.4) buffer and centrifuged at 800 g per 10 min at 4°C, and the supernatants were immediately used for measurements.

Catalase assay

The method used is based on the disappearance of H₂O₂ at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H₂O₂, 0.1% Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.0, and 0.1–0.3 mg protein/ml (Aebi, 1984). One CAT unit is defined as 1 μmol of hydrogen peroxide consumed per minute, and the specific activity is calculated as CAT units/mg protein.

Superoxide dismutase assay

SOD activity was determined according to Marklund (1985) based on pyrogallol autoxidation, a process highly dependent on superoxide radical. At 420 nm pyrogallol oxidation is analyzed per min in a mix with 50 mM Tris-HCl 1mM EDTA pH 8.2 buffer, 30 μM catalase, homogenate and 24 mM pyrogallol. A calibration curve was performed with purified SOD as standard, in order to calculate the activity of SOD present in the samples. A 50% inhibition of pyrogallol autoxidation is defined as one unit of SOD and the specific activity is represented as units/mg protein.

Glutathione peroxidase assay

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

Glucose-6-phosphate dehydrogenase assay

This assay was performed to measure the activity of G6PD and 6PGD, two enzymes of the pentose phosphate pathway produces NADPH. To obtain the total dehydrogenase activity, substrates for both dehydrogenase enzymes were added to a cuvette. The reaction mixture contained the following: 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM NADP⁺, 1 mM 6-phosphogluconate (6PGD substrate), 1 mM G6P (G6PD substrate), and the sample. In another cuvette, the same reaction mixture without G6P was used to obtain the activity of 6PGD alone. The reactions were started through the addition of 1 mM NADP⁺ and monitored in a spectrophotometer at 340 nm. One 6PGD unit is defined as one μmol NADPH produced per minute and specific activity is represented as 6PGD units/mg protein. Then, the G6PD activity was obtained by the subtraction of the total activity by the activity of 6PGD. One G6PD unit is defined as one μmol of NADPH produced per minute and specific activity is represented as G6PD units/mg protein (Leong and Clark 1984; Tian et al. 1994).

Thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS)

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

2'7'-dichlorofluorescein oxidation assay (DCF)

Reactive oxygen/nitrogen species production was measured following Lebel et al. (1992) method based on 2'7'-dichlorofluorescein (H_2DCF) oxidation. The 30 μL samples were incubated for 30 min at 37°C and dark with 30 μL 20 mM sodium phosphate and 140 mM KCl (pH 7.4) buffer and 240 μL 100 μM 2'7'-dichlorofluorescein diacetate ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) solution in a 96 wells plate. $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ is cleaved by cellular esterases and H_2DCF formed is eventually oxidized by ROS or RNS presenting in samples. The last reaction produces the fluorescent compound DCF which was measured at 488 nm excitation and 525 nm emission and the results were represented as nmol DCF/mg protein.

Protein determination

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

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by Student's *t* test, using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer. A value of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

Initially, we measured the effect of L-tyrosine administration for 7 days on the antioxidant enzymatic defenses in liver and brain of rats.

Figure 1 shows that the activity of SOD was significantly decreased in hypertyrosinemic rats when compared to control, both in liver (A) [$t(12)=3.762$; $p<0.05$] and brain (B) [$t(12)=12.018$; $p<0.01$]. Figure 2 shows that the administration of L-tyrosine caused a significant decrease of CAT activity in liver (A) [$t(9)=11.633$; $p<0.01$] and brain (B) [$t(11)=6.960$; $p<0.01$].

Figures 3A and 3B show a significant decrease of GPx activity in liver (A) [$t(10)=6.197$; $p<0.01$] and brain (B) [$t(11)=20.038$; $p<0.01$], showing an inhibition of about 50% in the brain when compared to control. The activity of G6PD is showed in figure 4 and it can be observed that hypertyrosinemia model was capable of causing a significant inhibition of G6PD activity in liver (A) [$t(11)=8.982$; $p<0.01$] and brain (B) [$t(12)=5.639$; $p<0.01$].

Figure 5 shows that the chronic administration of L-tyrosine was capable of increasing significantly the lipoperoxidation measured by the production of TBA-RS in

liver (A) [t(12)=2.688; p<0.05] and brain (B) [t(12)=3.283; p<0.01] when compared to control.

Finally, the formation of reactive species measured by production of DCF was evaluated and showed in figure 6. The chronic model of hypertyrosinemia was capable of increasing reactive species production in liver (A) [t(12)=2.663; p<0.05] and brain (B) [t(12)=2.929; p<0.05] of young rats.

Discussion

Inborn errors of tyrosine catabolism lead to increased concentration of this amino acid in tissues, brain-spinal fluid, blood and urine of patients characterizing the hypertyrosinemias type I (FAH deficiency) and type II (TAT deficiency) (Scott et al. 2006). Although symptoms of these disturbances are well described, the pathophysiological mechanisms caused by FAH and TAT deficiencies are broadly unknown. Then it is speculated that these damages are related with the abnormal increase of tyrosine levels found in these patients (Mitchell et al. 2001). In addition, studies *in vitro* and *in vivo* (acute model), demonstrated that tyrosine alters parameters of oxidative stress in rat cerebral cortex (Sgaravatti et al. 2008; Sgaravatti et al. 2009).

In this study, the influence of L-tyrosine chronic administration under antioxidant enzymatic defenses was evaluated in liver and brain of young rats. The activity of SOD, which turns superoxide radical into hydrogen peroxide (Halliwell e Gutteridge 1985), was decreased by administration of L-tyrosine in liver and brain of rats. In previous studies, SOD activity was not changed neither *in vitro* nor *in vivo* (acute model) by a single injection of tyrosine (Sgaravatti et al. 2008; Sgaravatti et al. 2009). Our results show that a longer insult of tyrosine is capable of affecting the

activity of this enzyme probably reducing the elimination of superoxide radical which, in turn, may increase the formation of other reactive species of oxygen and nitrogen.

CAT activity was also evaluated. This enzyme metabolizes hydrogen peroxide (H_2O_2) into water and molecular oxygen. In the present hypertyrosinemia model, CAT also had its activity inhibited in both analyzed tissues. This result corroborates with our previous results of *in vitro* tyrosine effect (Sgaravatti et al. 2008), indicating that this activity is probably affected by the presence of this amino acid. CAT inhibition may lead to an excessive concentration of H_2O_2 which, in turn, can itself decrease CAT activity, once H_2O_2 is capable of inactivating enzymes by oxidation of hyper-reactive sulfhydryl groups, which are essential for catalyzes, resulting in a vicious cycle (Halliwell and Gutteridge 2007).

We also evaluated the activity of GPx. This enzyme is capable of removing hydrogen peroxide and organic hydroperoxides (Halliwell e Gutteridge 1985) using reduced glutathione oxidation. In previous *in vitro* and acute models of hypertyrosinemia (Sgaravatti et al. 2008; Sgaravatti et al. 2009), the GPx activity was not changed in cerebral cortex of rats, but in our hypertyrosinemia chronic model, its activity was visibly inhibited in both analyzed tissues. So, it is presumed that the inhibition of this enzyme *in vivo* occurs through an indirect effect of this amino acid. In addition, this inhibition along with CAT inhibition points to a possible increase of H_2O_2 .

The last enzyme activity evaluated was G6PD, an enzyme of pentose phosphate pathway, which produces NADPH to attend cellular needs for reductive biosynthesis and maintenance of cellular redox state (Kletzien et al. 1994). G6PD activity was inhibited by L-tyrosine, in rat liver and brain, an effect that could promote a deficiency in the NADPH production and harm cell by altering redox balance. This effect may exacerbate the inhibition observed at GPx, once this enzyme activity depends on the

regeneration of reduced glutathione by reductase glutathione, which in turn, depends on NADPH produced mainly by G6PD (Hashida et al. 2002; Williams et al. 2004).

The influence of tyrosine chronic administration on lipid oxidation was also analyzed. TBA-RS reflects the malondialdehyde content, the most abundant aldehyde resultant of lipid peroxidation (Esterbauer and Cheeseman, 1990). We demonstrated that L-tyrosine was capable of increasing TBA-RS levels in liver and brain homogenates, demonstrating that L-tyrosine can promote lipoperoxidation, then, suggesting that oxidative damage in lipids could occur *in vivo*.

The last analyzed parameter was DCF formation which represents a nonspecific index of reactive species production. Hypertyrosinemia model increased the concentration of these compounds in liver and brain, confirming that tyrosine promotes an overproduction of reactive species.

According to the present results, it can be observed that L-tyrosine chronic administration to young rats alters various parameters of oxidative stress in liver and brain, diminishing antioxidant enzymatic defenses, inducing lipoperoxidation and increasing the production of reactive species. Thus, if these effects also occur in humans, it is possible that oxidative stress may contribute, besides other mechanisms, for hepatic and neurological dysfunctions characteristic of the hypertyrosinemias.

Acknowledgments

This study was supported by the research grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

(FAPERGS) and FINEP Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net #01.06.0842-00).

References

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

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

Halliwell B, Gutteridge JMC (1985) Oxygen radicals and the nervous system. *Trends Neurosci* 8:22-26.

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

Hashida K, Sakakura Y, Makino N (2002) Kinetic studies on the hydrogen peroxide elimination by cultured PC12 cells. *Biochim Biophys Acta* 1572: 85-90.

Held PK (2006) Disorders of tyrosine catabolism. *Mol Genet Metab* 88: 103-106.

Kletzien RF, Harris PKW, Foellmi LA (1994) Glucose 6-phosphate dehydrogenase: a “housekeeping” enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients and oxidant stress. *FASEB J* 8: 174-181.

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

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

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol. *J Biol Chem* 193: 265-275.

Macasai MS, Schwartz TL, Hinkle D, Hummel MB, Mulhern MG, Rootman D (2001) Tyrosinemia type II: nine cases of ocular signs and symptoms. *Am J Ophthalmol* 132: 522–527.

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

Masurel-Paulet A, Poggi-Bach J, Rolland MO, Bernard O, Guffon N, Dobbelaere D, Sarles J, Ogier de Baulny H, Touati G (2008) NTBC treatment in tyrosinaemia type I: Long-term outcome in French patients. *J Inherit Metab Dis* 31: 81-87.

Mitchell GA, Grompe M, Lambert M, Tanguay RM (2001) Hypertyrosinemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Ed.) *The metabolic and molecular bases inherited disease*. 8^a ed. New York: McGraw-Hill 1977-1982.

Natt E, Westphal EM, Toth-Fejel SE, Magenis RE, Buist NR, Rettenmeier R, Scherer G (1987) Inherited and de novo deletion of the tyrosine aminotransferase gene locus at 16q22.1–q22.3 in a patient with tyrosinemia type II. *Hum Genet* 77: 352–358.

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

Pass K, Morrissey M (2008) Enhancing newborn screening for tyrosinemia type I. *Clinical Chemistry* 54: 627-629.

Scott CR (2006) The genetic tyrosinemias. *American Journal of Med Genetics Part C. Semin Med Genet* 142: 121-126.

Scriver CR, Kaufman S (2001) Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Walle D (Ed.). *The Metabolic & Molecular Inherited Disease*. 8^a ed. New York: McGraw-Hill 77: 1667-1724.

Sgaravatti A, Magnusson A, Oliveira A, Rosa A, Mescka C, Zanin F, Pederzoli C, Wyse A, Wannmacher C, Wajner M, Dutra-Filho CS (2009) Tyrosine administration decreases glutathione and stimulates lipid and protein oxidation in rat cerebral cortex. *Metab Brain Dis* 24: 415–425.

Sgaravatti A, Vargas B, Zandoná B, Deckmann K, Rockenback F, Moraes T, Monseratt J, Sgarbi M, Pederzoli C, Wyse A, Wannmacher C, Wajner M, Dutra-Filho CS (2008) Tyrosine promotes oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *Int J Devl Neuroscience* 26: 551-559.

Tian WN, Pignatere JN, Stanton RC (1994) Signal transduction proteins that associate with the platelet-derived growth factor (PDGF) receptor mediate the PDGF-induced

release of glucose-6-phosphate dehydrogenase from permeabilized cells. *J Biol Chem* 269:14798–14805.

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 Inher Metabol Dis* 27: 427-448.

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

Williams AC, Ford WCL (2004) Functional Significance of the pentose phosphate pathway and glutathione reductase in the antioxidant defenses of human sperm. *Biol Reprod* 71: 1309-1316.

Figure Captions

Fig 1: Effect of L-tyrosine chronic administration on the activity of superoxide dismutase (SOD) in homogenates of liver (A) and brain (B) of young rats. Results are mean \pm SD (n= 7), * p<0.05 and ** p<0.01 compared to control (Student's t test).

Fig 2: Effect of L-tyrosine chronic administration on the enzyme activity of catalase (CAT) in homogenates of liver (A) and brain (B) of young rats. Results are mean \pm SD (n= 5-7), ** p<0.01 compared to control (Student's t test).

Fig 3: Effect of L-tyrosine chronic administration on the enzyme activity of glutathione peroxidase (GPx) in homogenates of liver (A) and brain (B) of young rats. Results are mean \pm SD (n= 5-7), ** p<0.01 compared to control (Student's t test).

Fig 4: Effect of L-tyrosine chronic administration on the enzyme activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) in homogenates of liver (A) and brain (B) of young rats. Results are mean \pm SD (n= 6-7), ** p<0.01 compared to control (Student's t test).

Fig 5: Effect of L-tyrosine chronic administration about the TBA-RS content in homogenates of liver (A) and brain (B) of young rats. Results are mean \pm SD (n= 7), * p<0.05 and ** p<0.01 compared to control (Student's t test).

Fig 6: Effect of L-tyrosine chronic administration on the production of reactive species in homogenates of liver (A) and brain (B) of young rats. Results are mean \pm SD (n=7), * p<0.05 compared to control (Student's t test).

Figure 1

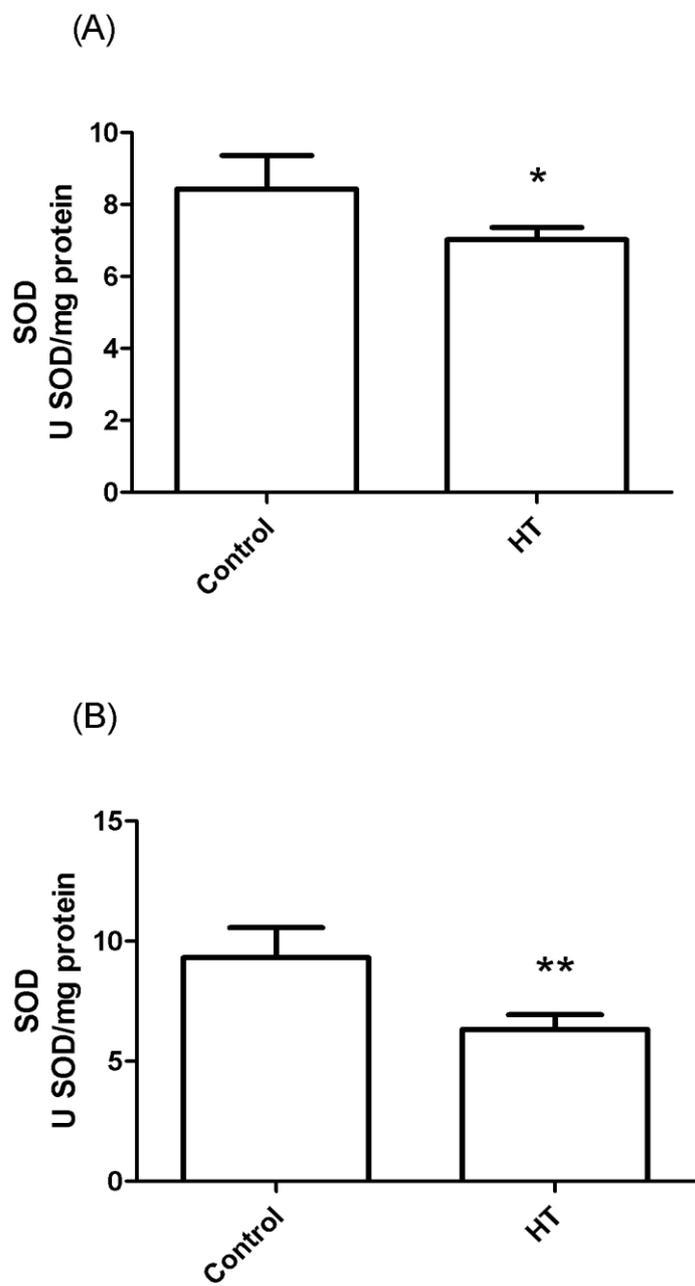


Figure 2

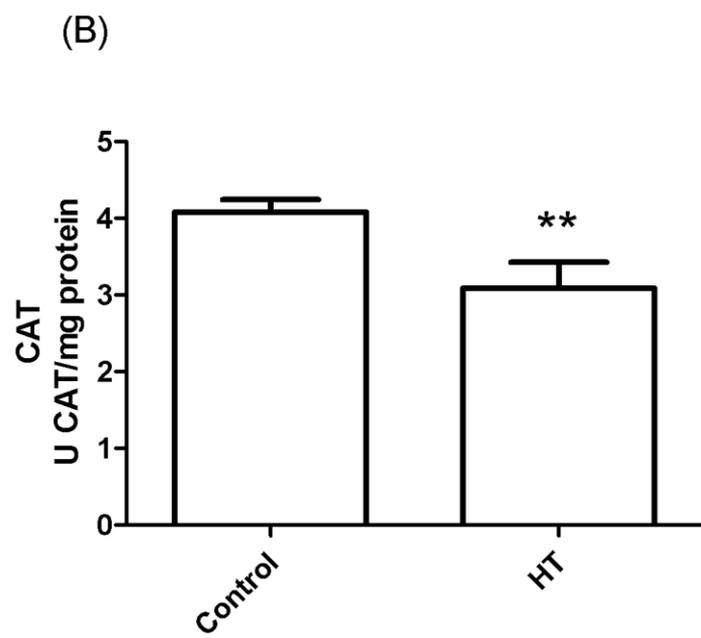
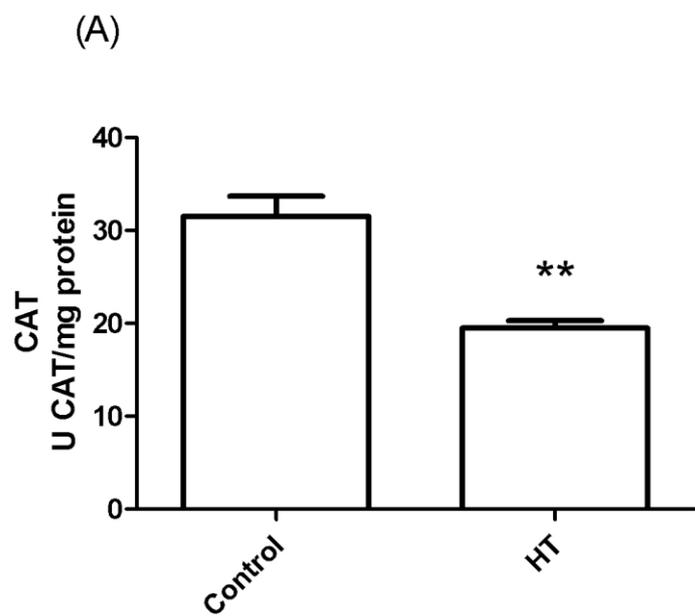


Figure 3

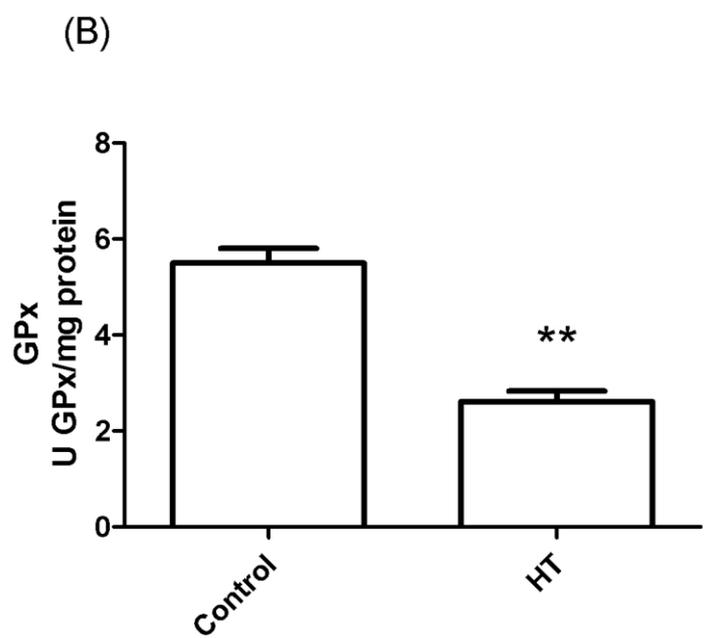
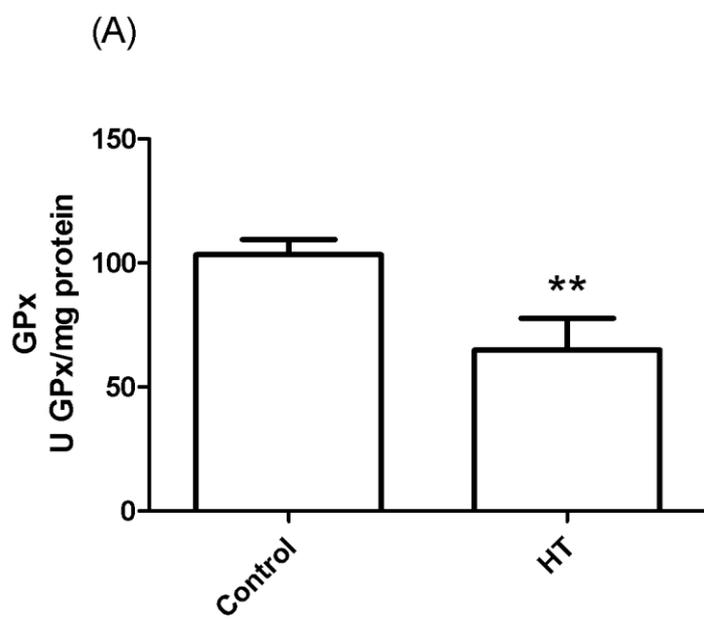


Figure 4

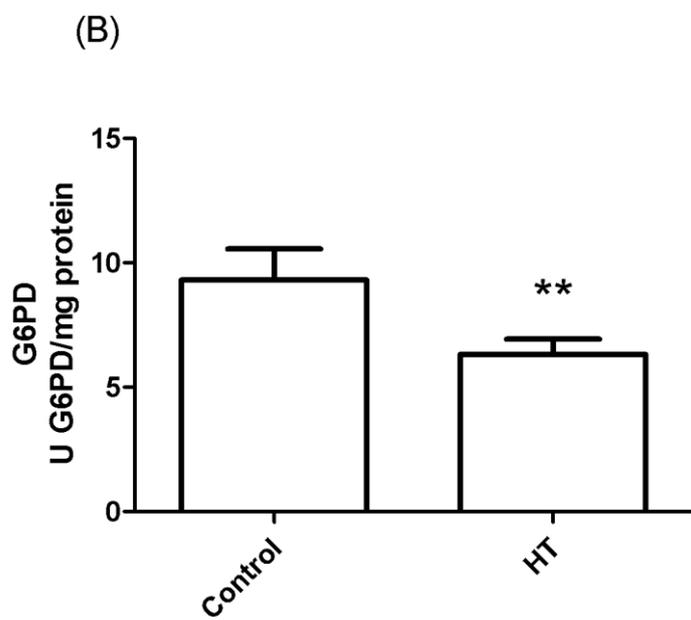
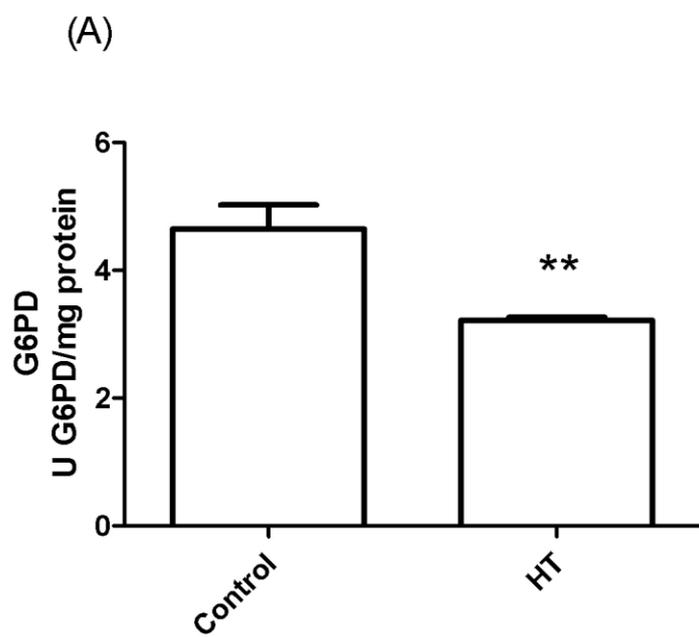


Figure 5

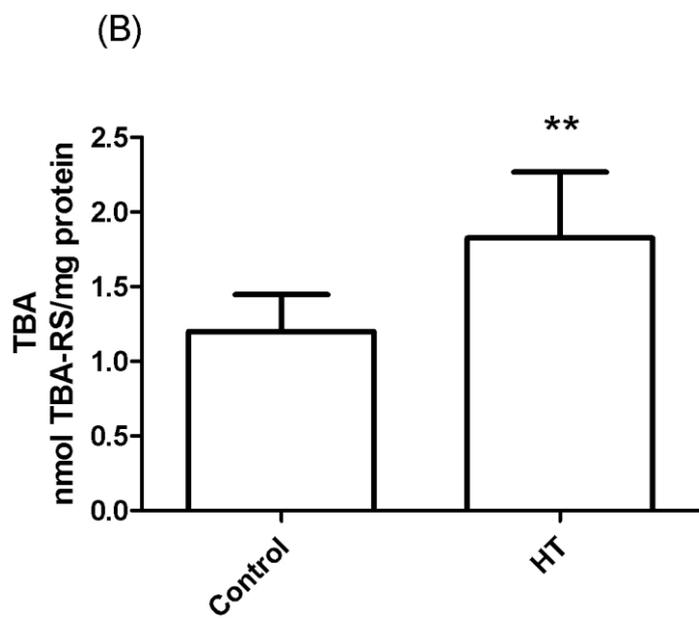
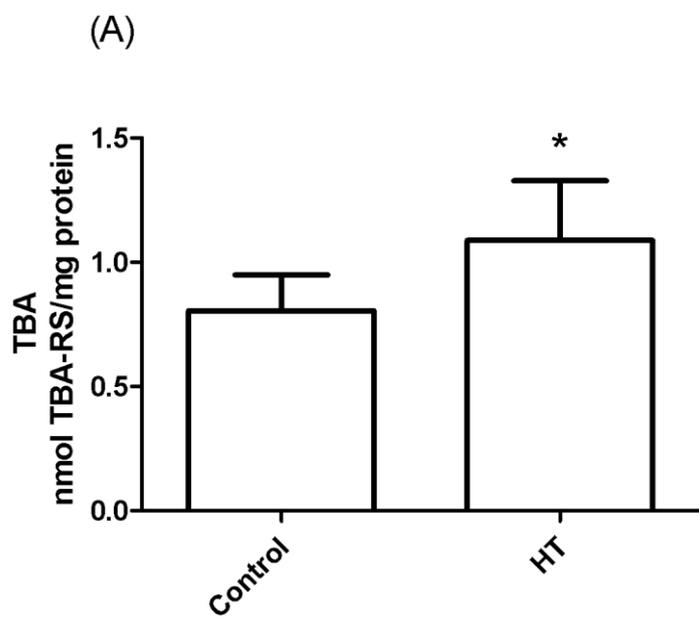
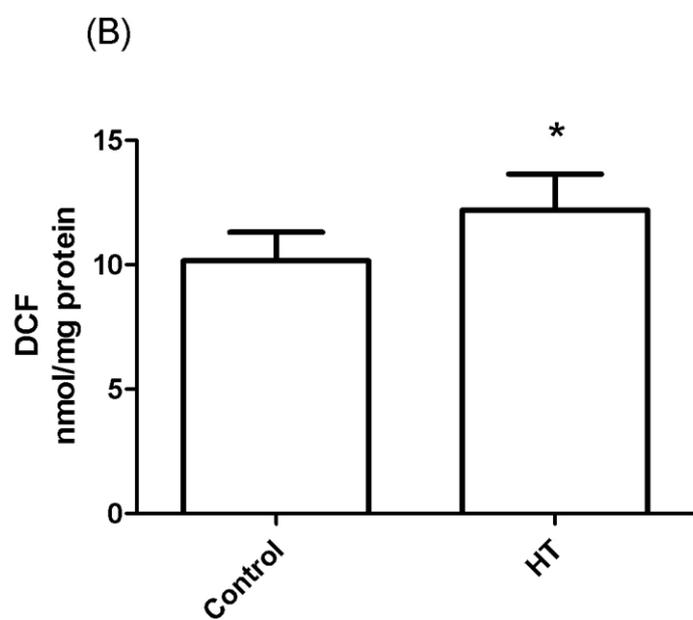
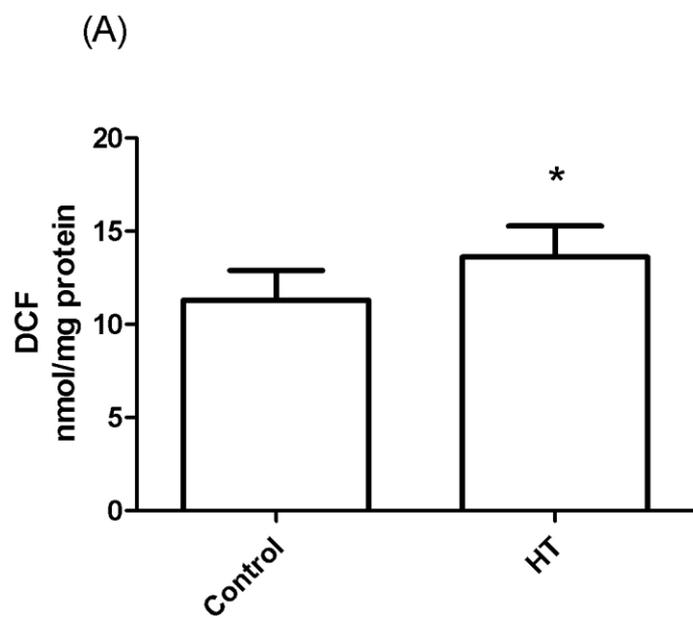


Figure 6



Capítulo II – Resultados não incluídos em artigo.

Materiais e Métodos

Equipamentos

Todos os reagentes foram comprados da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Um espectrofotômetro SpectraMax M5/M5 Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA) foi utilizado para a medição. Eppendorf 5417R e 5403 foram usados para processos de centrifugação.

Modelo agudo de hipertirosinemia

Ratos Wistar de 14 dias de vida foram obtidos junto ao Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS. Um modelo agudo de hipertirosinemia foi induzido quimicamente, de acordo com Sgaravatti e colaboradores (2009) com modificações. Foi administrado, pela via intraperitoneal, L-tirosina metil éster que foi dissolvida em 0,1% de Tween 20 em solução salina (pH ajustado para 7,4) e com dose equivalente a 500 mg/Kg de peso corporal. O grupo Controle recebeu 0,1% de Tween 20 dissolvido em solução salina, uma hora após a injeção os animais foram sacrificados.

Preparação do tecido

Uma hora após a injeção, os ratos foram anestesiados com 85 mg/Kg de cetamina e 3 mg/Kg de xilazina (via intraperitoneal), sofreram perfusão com solução salina e o fígado foi retirado imediatamente e mantido no gelo, após os ratos foram mortos por decapitação. O fígado foi pesado e homogeneizado em 10 volumes (1:10 p/v) no tampão fosfato de sódio 20 mM com KCl 140 mM pH 7,4. Em seguida, as

amostras foram centrifugadas a 800 g por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para as medidas de parâmetros de estresse oxidativo.

Medida do conteúdo de grupos carbonilas

A medida do conteúdo de carbonilas foi realizada por um método baseado na reação de carbonilas com dinitrofenilhidrazina (DNPH) formando dinitrofenilidrazona, um composto amarelo, medido espectrofotometricamente a 370 nm (Reznick e Packer, 1994). O conteúdo de carbonilas e os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

Resultados

Modelo Agudo

A figura 1 mostra que a administração aguda de L-tirosina não alterou a produção de TBA-RS no homogeneizado de fígado quando comparado ao controle [t(12)=1,927; p>0,05].

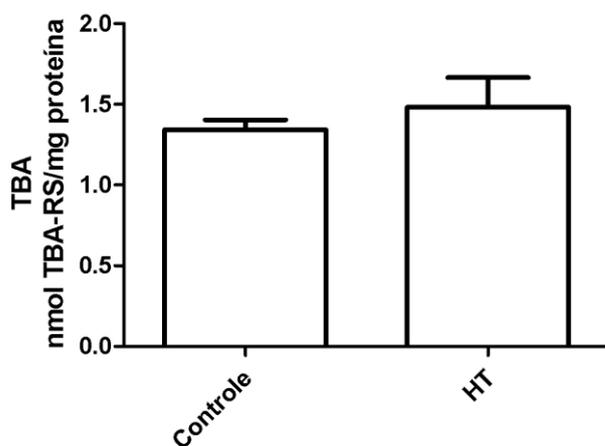


Figura 1: Efeito da administração aguda de L-tirosina sobre o conteúdo de TBA-RS em homogeneizados de fígado de ratos Wistar de 14 dias. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão (n= 7), *p<0,05 comparado com o controle (teste t de Student).

O parâmetro de dano protéico está representado na figura 2. O resultado não mostra alteração no conteúdo de carbonilas no experimento agudo [t(12)=1,672; p>0,05].

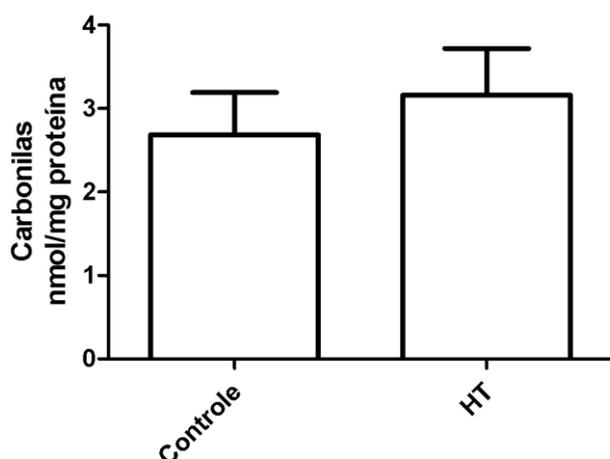
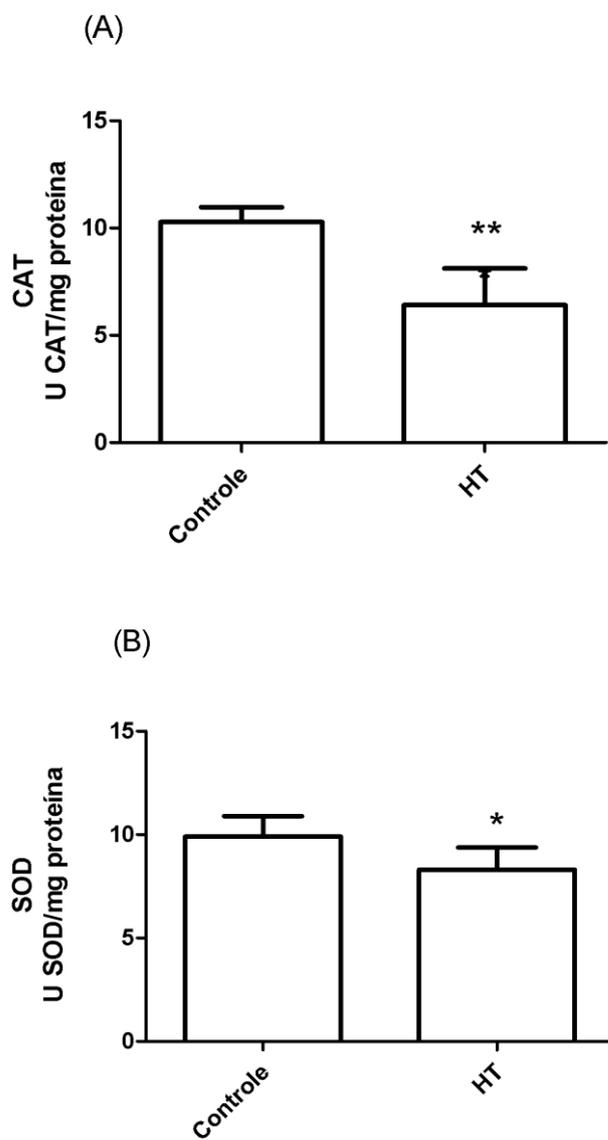


Figura 2: Conteúdo de carbonilas formado. Efeito da administração aguda de L-tirosina em homogeneizados de fígado de ratos Wistar de 14 dias. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão (n= 7), *p<0,05 comparado com o controle (teste t de Student).

As atividades das enzimas antioxidantes foram mensuradas e mostradas na figura 3. Pode-se observar que a administração aguda de L-tirosina diminuiu significativamente as atividades da CAT [t(11)=5,489; p<0,01] e da SOD [t(10)=2,628;

$p < 0,05$]. Enquanto que as atividades da GPx [$t(12)=0,483$; $p > 0,05$] e da G6PD [$t(10)=1,139$; $p > 0,05$] não foram alteradas quando comparadas ao controle.



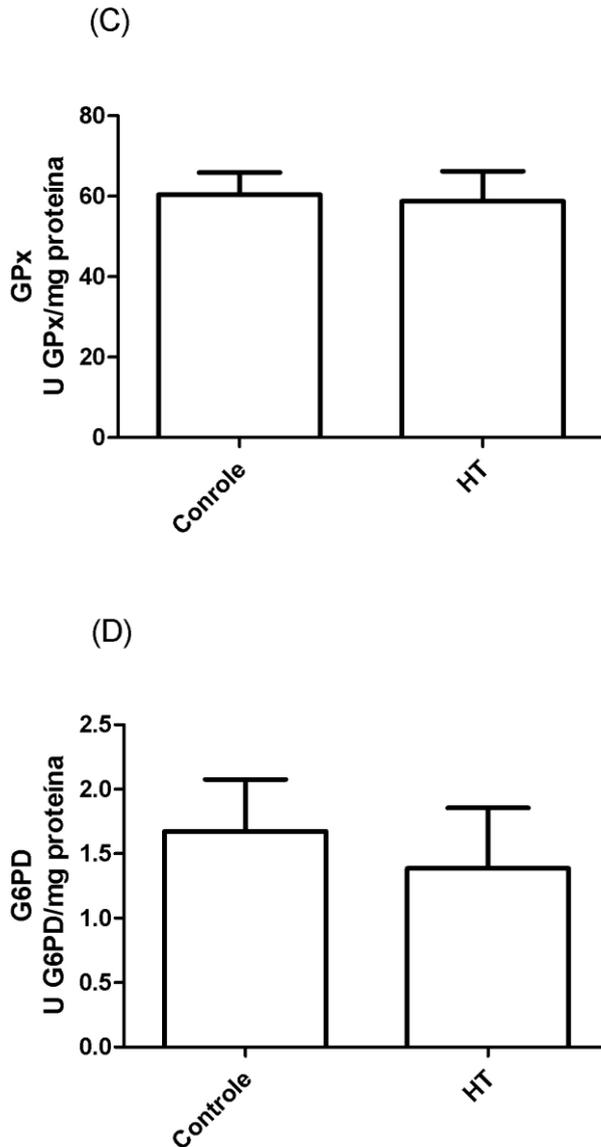


Figura 3: Efeito agudo da L-tirosina na atividade das enzimas antioxidantes em fígado de ratos jovens. A, catalase (n=6-7); B, superóxido dismutase (n=5-7); C, glutational peroxidase (n=7) e D, glicose 6-fosfato desidrogenase (n=5-7), * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado com o controle (teste t de Student).

Por último, foi analisada a formação de espécies reativas e mostrada na figura 4. O modelo agudo de hipertirosinemia não foi capaz de alterar a produção de DCF [t(9)=1,279; $p > 0,05$] em fígado de ratos jovens.

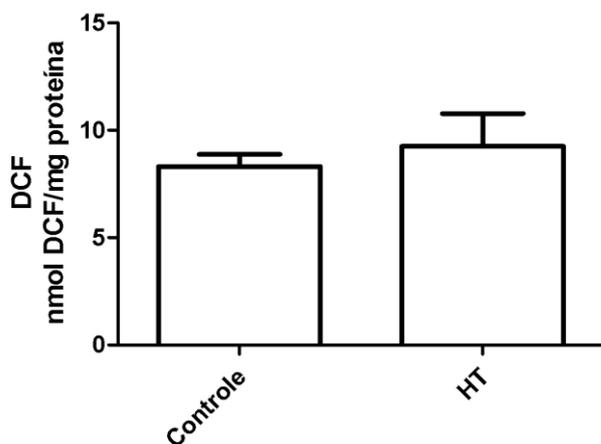
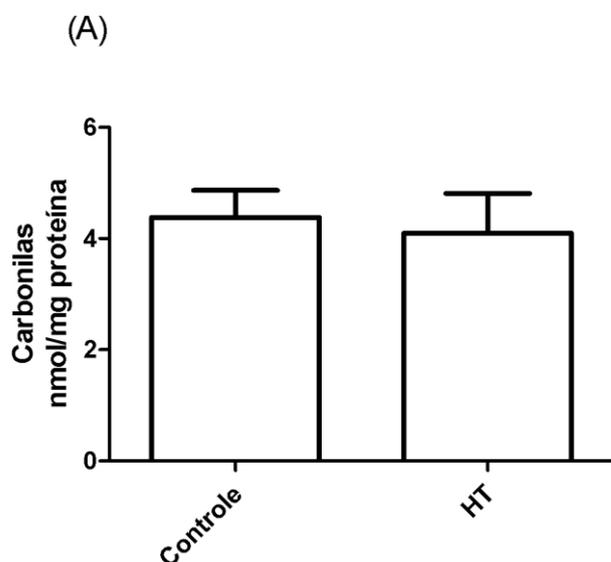


Figura 4: Efeito da administração aguda de L-tirosina na produção de espécies reativas em homogeneizados de fígado de ratos Wistar de 14 dias. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão (n=5-6), * $p < 0,05$ comparado com o controle (teste t de Student).

Modelo crônico

A figura 5 mostra que a administração crônica de L-tirosina não foi capaz de alterar o conteúdo de carbonilas em homogeneizado de fígado [$t(12)=0,872$; $p > 0,05$] e de cérebro [$t(12)=0,035$; $p > 0,05$] de ratos quando comparados ao controle.



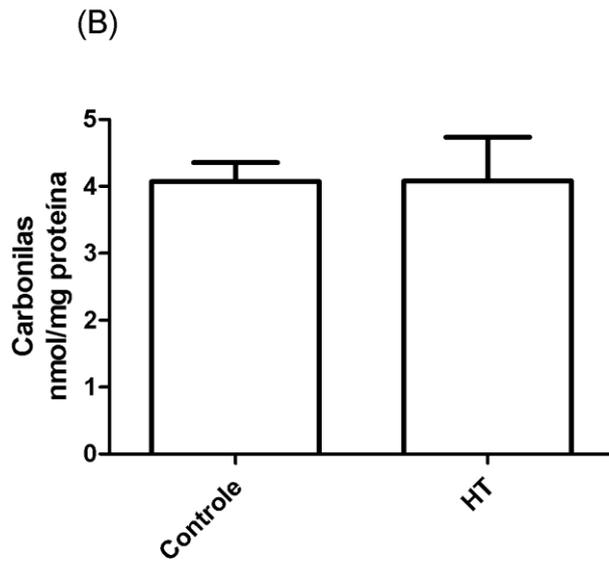


Figura 5: Conteúdo de carbonilas formado. Efeito da administração crônica de L-tirosina em homogeneizados de fígado (A) e cérebro (B) de ratos Wistar de 14 dias. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão (n= 7), * $p < 0,05$ comparado com o controle (teste t de Student).

Parte III

DISCUSSÃO

As tirosinemias são caracterizadas pela elevada concentração de tirosina nos tecidos e fluidos fisiológicos dos indivíduos afetados (Mitchell et al., 2001; Held, 2006). A tirosinemia tipo I (deficiência da FAH) é conhecida por ser a forma mais grave entre as tirosinemias. A deficiência dessa enzima leva ao acúmulo de metabólitos tóxicos, os quais são responsáveis por problemas hepáticos e renais característicos da doença (Mitchell et al., 2001; Held, 2006; Masurel-Paulet et al., 2008). No entanto, a maior concentração deste aminoácido se encontra nos pacientes com tirosinemia tipo II (deficiência da TAT). A deficiência da TAT leva a manifestações clínicas como, lesões oculares, cutâneas e, ocasionalmente, a alterações neurológicas que podem variar de um leve decréscimo na inteligência até retardo mental severo associado à microcefalia (Mitchell et al., 2001).

Estudos recentes mostram que o estresse oxidativo pode estar envolvido na fisiopatologia de doenças do metabolismo, dentre elas, a tirosinemia (Sgaravatti et al., 2008; Sgaravatti et al., 2009). A administração de FAA e MAA pode diminuir os níveis de glutathione (GSH), importante antioxidante celular, sugerindo o envolvimento de espécies reativas na HTI (Bird et al., 1995). Além disso, Sgaravatti et al., (2008) mostrou que a incubação de L-tirosina em tecido cerebral alterou diversos parâmetros de estresse oxidativo, como o potencial antioxidante total, conteúdo de tióis e de ácido ascórbico, dano ao DNA e atividade da catalase. E estudos com um modelo agudo de tirosinemia mostraram que houve aumento da lipoperoxidação, do conteúdo de carbonilas protéicas e da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase, e diminuição do conteúdo de tióis e de GSH no sistema nervoso (Sgaravatti et al., 2009).

Considerando que há pouca informação disponível sobre o possível papel do estresse oxidativo nos mecanismos de hepato e neurotoxicidade da tirosina e de sua

participação nas disfunções observadas nos pacientes hipertirosinêmicos, especialmente do tipo I e tipo II, respectivamente, os efeitos da administração aguda de L-tirosina no fígado e da administração crônica no fígado e no cérebro foram avaliados sobre diversos parâmetros de estresse oxidativo em ratos Wistar.

Inicialmente, foi feito o modelo agudo de hipertirosinemia, onde a atividade das enzimas antioxidantes foi analisada em fígado e os resultados mostraram que a tirosina inibiu a atividade da CAT e da SOD, mas não alterou a da GPx e a da G6PD. A catalase é uma enzima que converte peróxido de hidrogênio em uma molécula de oxigênio e água. Esta enzima foi inibida em ratos hipertirosinêmicos o que pode levar ao acúmulo de peróxido de hidrogênio. Um estudo *in vitro* em homogeneizados de córtex cerebral mostrou uma inibição direta da tirosina na atividade da CAT (Sgaravatti et al., 2008), assim é possível que com a inibição da CAT, ocorra uma concentração excessiva de H₂O₂, que por sua vez pode diminuir a atividade da CAT, uma vez que o H₂O₂ é capaz de inativar enzimas por oxidação de grupos sulfidrílicos essenciais para a catálise, resultando em um ciclo vicioso (Halliwell and Gutteridge, 2007). A SOD que tem como função a dismutação do radical ânion superóxido a peróxido de hidrogênio (Halliwell e Gutteridge, 1985), também teve sua atividade inibida pela administração de L-tirosina em homogeneizados de fígado. Em estudos anteriores, a atividade da SOD não foi alterada nem *in vitro* nem no modelo agudo de córtex cerebral (Sgaravatti et al., 2008; Sgaravatti et al., 2009), o nosso resultado demonstra que a tirosina é capaz de afetar a atividade desta enzima no fígado de ratos jovens, podendo levar a um acúmulo de radicais ânion superóxido e assim aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Já a atividade da GPx, que remove peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos (Halliwell e Gutteridge, 1985), através da oxidação da glutathione reduzida, não foi alterada pela tirosina. A última enzima analisada foi a

G6PD, que é uma enzima da via das pentoses fosfato que gera NADPH como um produto final (Leong e Clark, 1984), também não teve sua atividade alterada pela administração aguda de L-tirosina. Portanto, a preservação da atividade G6PD está de acordo com a preservação da GPx, uma vez que a atividade desta enzima depende da regeneração da glutathiona reduzida por glutathiona redutase, que por sua vez depende de NADPH, que é dependente de uma atividade normal de G6PD (Hashida et al., 2002; Williams et al., 2004).

Para avaliar o dano oxidativo a lipídios e a proteínas, o TBA-RS e o conteúdo de carbonilas foram determinados, respectivamente. Os dados mostraram que os níveis de TBA-RS não foram alterados, sugerindo que L-tirosina não induz o dano oxidativo a lipídios em homogeneizados de fígado. O acúmulo de L-tirosina no fígado também não foi capaz de alterar o conteúdo de carbonilas, mostrando que estas podem ser preservadas contra a degradação de proteínas oxidadas e/ou contra a modificação oxidativa dessas proteínas. Estes resultados não corroboram o encontrado no modelo agudo de hipertirosinemia em córtex cerebral (Sgaravatti et al., 2009), no entanto, o fígado possui altos níveis de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, tornando-o menos susceptível a danos gerados oxidativamente quando comparado ao cérebro.

O último parâmetro analisado foi a formação de DCF que representa um índice inespecífico de produção de espécies reativas. Este modelo não foi capaz de alterar a produção de DCF, demonstrando que este insulto de tirosina não é suficiente para aumentar de forma generalizada a concentração destes compostos.

Já no modelo crônico de hipertirosinemia, a administração de 500 mg/Kg de L-tirosina inibiu a atividade das enzimas CAT, SOD, GPx e G6PD, aumentou a lipoperoxidação e a produção de DCF, mas não foi capaz de gerar dano a proteínas em fígado e cérebro de ratos jovens.

A atividade da CAT foi inibida nos dois tecidos analisados, estes resultados corroboram o encontrado no modelo *in vitro* de córtex cerebral (Sgaravatti et al., 2008) e no nosso modelo agudo em fígado. Assim, reforçando a possibilidade de formação de um ciclo vicioso em consequência do efeito da L-tirosina sobre a CAT (Halliwell and Gutteridge 2007). A SOD também teve sua atividade inibida pela administração de L-tirosina tanto em fígado como em cérebro. Em estudos anteriores, a atividade da SOD não foi alterada nem *in vitro* nem modelo agudo de córtex cerebral (Sgaravatti et al., 2008; Sgaravatti et al., 2009), no entanto, este resultado corrobora o encontrado no nosso modelo agudo, demonstrando que um insulto maior de tirosina é capaz de afetar a atividade desta enzima, podendo levar a um acúmulo de radicais ânion superóxido e assim aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. A atividade da GPx foi visivelmente inibida em ambos os tecidos, então presume-se que a inibição desta enzima *in vivo* ocorra através de um efeito indireto deste aminoácido, assim contribuindo junto com a inibição da CAT para um possível aumento de H₂O₂. Tanto no fígado quanto no cérebro dos ratos, a G6PD teve sua atividade inibida pela L-tirosina, isso poderia promover uma deficiência na produção de NADPH e alterar o balanço redox da célula. Este efeito pode acentuar a inibição observada na GPx, uma vez que a atividade desta enzima depende da regeneração da glutathione reduzida por glutathione reductase, que por sua vez depende de NADPH, produzido principalmente por G6PD (Hashida et al., 2002; Williams et al., 2004).

A influência da administração crônica de L-tirosina na oxidação lipídica e protéica também foram analisadas. Nós demonstramos que a L-tirosina foi capaz de aumentar os níveis de TBA-RS em homogeneizados de fígado e de cérebro, mostrando que a L-tirosina pode promover a lipoperoxidação, então, sugerindo que o dano oxidativo a lipídios possa ocorrer *in vivo*. No entanto, não houve dano protéico em

nenhum dos tecidos analisados, demonstrando que mesmo com um insulto mais prolongado deste aminoácido as proteínas foram preservadas da degradação.

O último parâmetro analisado foi a formação de DCF que representa um índice inespecífico de produção de espécies reativas. O modelo crônico de hipertirosinemia aumentou a concentração destes compostos em ambos tecidos, confirmando que a administração repetida de tirosina é capaz de aumentar a produção de espécies reativas.

CONCLUSÃO

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

1. No modelo agudo de hipertirosinemia, foi possível observar que ocorre uma diminuição em algumas das defesas antioxidantes enzimáticas (CAT e SOD), embora não tenhamos observado nenhum dano oxidativo, demonstrando que a situação de hipertirosinemia não é uma situação fisiológica, o que pode colocar a célula em risco.

2. Já no modelo crônico, pôde-se observar que tanto em fígado quando em cérebro, houve alteração das defesas antioxidantes enzimáticas, demonstrando que essas defesas estão sendo usadas para a manutenção do estado redox da célula. Além disso, foi capaz de induzir a lipoperoxidação e aumentar a produção de espécies reativas. Sendo assim, se esses efeitos também ocorrerem em humanos, é possível que o estresse oxidativo possa contribuir, além de outros mecanismos, para as disfunções hepáticas e neurológicas características das hipertirosinemias. No entanto, é importante salientar que para melhor definir o que de fato está acontecendo, mais estudos ainda precisam ser realizados e outros parâmetros analisados.

PERSPECTIVAS

1. Avaliar as defesas antioxidantes não-enzimáticas em ambos os modelos.
2. Analisar outros parâmetros de dano oxidativo protéico.
3. Analisar a formação de dano ao DNA.
4. Estudar o efeito de algum antioxidante no modelo crônico de hipertirosinemia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

Bird, S.; Miller, N.; Collins, J.; Rice-Evans, C. (1995) Plasma antioxidant capacity in two cases of tyrosinaemia type 1: one case treated with NTBC. *Journal Inher. Metab. Disease*, 18: 123-126.

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

Chance, B.; Sies, H.; Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, 59: 527-605.

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

Endo, F.; Sun, M. (2002) Tyrosinaemia type I and apoptosis of hepatocytes and renal tubular cells. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 25: 227-234.

Ferreira, A.; da Cunha, A.; Machado, F.; Pederzoli, C.; Dalazen, G.; de Assis, A.; Lamers, M.; dos Santos, M.; Dutra-Filho, C.; Wyse, A. (2012) Experimental hyperprolinemia induces mild oxidative stress, metabolic changes, and tissue adaptation in rat liver. *Journal of cellular biochemistry*, 113: 174-183.

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

Fridovich, I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.*, 64: 97-112.

Giugliani, R. (1988) Erros inatos do metabolismo: uma visão panorâmica. *Pediatria moderna*, 23: 29-40.

Goldsmith, L.A.; Kang, E.; Bienfang, D.C.; Jimbow, K.; Gerald, P.; Baden, H.P.; (1973) Tyrosinemia with plantar and palmar keratosis and keratitis. *J. Pediatr.*, 83: 798–805.

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

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

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

Hashida, K.; Sakakura, Y.; Makino, N. (2002) Kinetic studies on the hydrogen peroxide elimination by cultured PC12 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1572: 85-90.

Held, P.K. (2006) Disorders of tyrosine catabolism. *Mol. Genet. Metab.*, 88: 103-106.

Kienzle-Hagen, M.E.; Pederzoli, C.D.; Sgaravatti, A.M.; Bridi, R.; Wajner, M.; Wannmacher, 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.

Langlois, C.; Jorquera, R.; Finegold, M.; Shroads, A.; Stacpoole, P.; Tanguay, R. (2006) Evaluation of dichloroacetate treatment in a murine model of hereditary tyrosine type I. *Biochemical pharmacology* 71: 1648-1661.

Langlois, C.; Jorquera, R.; Orejuela, D.; Bergeron, A.; Finegold, M.; Rhead, W.; Tanguay, R. (2008) Rescue from neonatal death in the murine model of hereditary tyrosinemia by glutathione monoethylester and vitamin C treatment. *Mol. Genet. and Metabol.*, 93: 306-313.

Leong, S.F.; Clark, J.B. (1984) Regional enzyme development in rat brain. Enzymes associated with glucose utilization. *Biochem J*, 218: 131-138.

Lindstedt, S.; Holme, E.; Lock, E.; Hjalmarson, O.; Strandvik, B. (1992) Treatment of hereditary tyrosinaemia type I by inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *The lancet.*, 340: 813-817.

Luijckx, M.; Jacobs, S.; Beurden, E.; Koornneef, L.P.; Klomp, L.W.; Berger, R.; van den Berg, I.E. (2003) Extensive changes in liver gene expression induced by Hereditary Tyrosinemia type I are not normalized by treatment with 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3 cyclohexanedione (NTBC). *Journal of Hepatology* 39: 901–909.

Macasai, M.S.; Schwartz, T.L.; Hinkle, D.; Hummel, M.B.; Mulhern, M.G.; Rootman, D. (2001) Tyrosinemia type II: nine cases of ocular signs and symptoms. *Am. J. Ophthalmol.*, 132: 522–527.

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

Masurel-Paulet, A.; Poggi-Bach, J.; Rolland, M.O.; Bernard, O.; Guffon, N.; Dobbelaere, D.; Sarles, J.; Ogier de Baulny, H.; Touati, G. (2008) NTBC treatment in tyrosinaemia type I: Long-term outcome in French patients. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 31: 81-87.

Matté, C.; Monteiro, S.C.; Calcagnotto, T.; Bavaresco, C.S.; Netto, C.A.; Wyse, A.T.S. (2004) *In vitro* and *in vivo* effects of homocysteine on Na⁺,K⁺-ATPase activity in

parietal, prefrontal and cingulate cortex of young rats. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 22: 185-190.

Mitchell, G.A.; Grompe, M.; Lambert, M.; Tanguay, R.M. (2001) Hypertyrosinemia. In: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. (Ed.) *The metabolic and molecular bases inherited disease*. 8^a ed. New York: McGraw-Hill, 1977-1982.

Natt, E.; Westphal, E.M.; Toth-Fejel, S.E.; Magenis, R.E.; Buist, N.R.; Rettenmeier, R.; Scherer, G. (1987) Inherited and de novo deletion of the tyrosine aminotransferase gene locus at 16q22.1–q22.3 in a patient with tyrosinemia type II. *Hum. Genet.*, 77: 352–358.

Pass, K.; Morrissey, M. (2008) Enhancing newborn screening for tyrosinemia type I. *Clinical Chemistry*, 54: 627-629.

Rabinowitz, L.G.; Williams, R.L.; Anderson, C.E.; Mazur, A.; Kaplan, P.; (1995) Painful keratoderma and photophobia: hallmarks of tyrosinemia type II. *J. Pediatr.*, 126: 266–269.

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

Saudubray, J.M.; Nassogne, M.C.; de Lonlay, P.; Touati, G. (2002) Clinical approach to inherited metabolic disorders in neonates: an overview. *Semin. Neonatol.*, 7: 3-15.

Scott, C.R. (2006) The genetic tyrosinemias. *American Journal of Med Genetics Part C. Semin. Med. Genet.*, 142: 121-126.

Scriver C.R. and Kaufman S. (2001) Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Walle D. (Ed.). *The Metabolic & Molecular Inherited Disease*. 8^a ed. New York: McGraw-Hill, 77: 1667-1724.

Sgaravatti, A.; Magnusson, A.; Oliveira, A.; Rosa, A.; Mescka, C.; Zanin, F.; Pederzoli, C.; Wyse, A.; Wannmacher. C.; Wajner, M.; Dutra-Filho, C. (2009) Tyrosine administration decreases glutathione and stimulates lipid and protein oxidation in rat cerebral cortex. *Metab. Brain Dis.*, 24: 415–425.

Sgaravatti, A.; Vargas, B.; Zandoná, B.; Deckmann, K.; Rockenback, F.; Moraes, T.; Monseratt. J.; Sgarbi, M.; Pederzoli, C.; Wyse, A.; Wannmacher. C.; Wajner, M.; Dutra-Filho, C. (2008) Tyrosine promotes oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *Int. J. Devl. Neuroscience*, 26: 551-559.

Southorn, P.A.; Powis, G. (1988) Free radicals in medicine I. Chemical nature and biological reactions. *Mayo Clin. Proc.*, 63: 381-389.

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. Metabol. Dis.*, 27: 427-448.

Ward, R.J.; Peters, T.J. (1995) Free Radicals. In: Marshall, W.J.; Bangert, S.K. (Eds.). Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects. New York: Churchill Livingstone, P. 765-777.

Williams, A.C.; Ford, W.C.L. (2004) Functional Significance of the pentose phosphate pathway and glutathione reductase in the antioxidant defenses of human sperm. Biol. Reprod., 71: 1309-1316.

Wyse, A.T.S.; Bavaresco, C.S.; Kienzle-Hagen, M.E.; Delwing, D.; Wannmacher, C.M.D.; Dutra-Filho, C.S.; Wajner, M. (2001) *In vitro* stimulation of oxidative stress in cerebral cortex of rats by the guanidino compounds accumulating in hyperargininemia. Brain Res., 923: 50-57.