

# Efeito *in vivo* da silibinina sobre parâmetros de estresse oxidativo contra a neurotoxicidade da fenilalanina



T.H. da Rosa, C.S. Dutra-Filho.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

## Introdução

A fenilcetonúria (PKU) é uma doença metabólica causada pela deficiência da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), levando ao acúmulo de fenilalanina (Phe) e de seus metabólitos. As principais características clínicas dos pacientes com PKU não tratados são o comprometimento neuropsicológico e o retardo no desenvolvimento. O estresse oxidativo tem sido relatado em muitos erros inatos do metabolismo, incluindo PKU. A silibinina (Sil) é um flavonoide proveniente da planta cardo de leite (*Silybum marianum*) que apresenta propriedades antioxidantes e que, após administração, é amplamente distribuída pelos tecidos. Neste trabalho, nós investigamos os efeitos da silibinina *in vivo* contra o estresse oxidativo causado por elevados níveis de Phe (HPA).

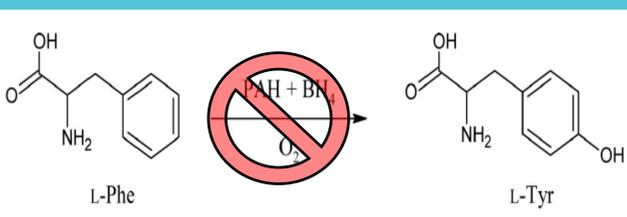


Fig. 1. Modelo esquemático da PKU.

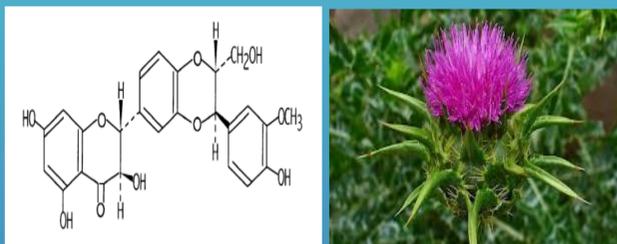


Fig. 2. Estrutura molecular da silibinina e planta cardo de leite (*Silybum marianum*).

## Materiais e métodos

Ratos Wistar receberam injeções intraperitoneais (IP) de Sil do 12<sup>o</sup> ao 14<sup>o</sup> dia de vida. Para simular o modelo de HPA os animais foram submetidos a injeções subcutâneas (SC) de  $\alpha$ -metilfenilalanina no 13<sup>o</sup> dia e de Phe no 14<sup>o</sup> dia. Os ratos foram mortos uma hora após a última injeção. O cérebro foi removido e homogeneizado e usado para medir os parâmetros de estresse oxidativo.

	Controle	Sil	Phe	Phe + Sil
<b>Dia 1</b>	Salina IP	Silibinina IP	Salina IP	Silibinina IP
<b>Dia 2</b>	Salina IP + Salina SC	Silibinina IP + Salina SC	Salina IP + $\alpha$ metil-fenilalana SC	Silibinina IP + $\alpha$ metil-fenilalana SC
<b>Dia 3</b>	Salina IP + Salina SC	Silibinina IP + Salina SC	Salina IP + Fenilalana SC	Silibinina IP + Fenilalana SC

## Parâmetros de estresse oxidativo

- Catalase (CAT) : Aebi, 1984.
- Superóxido Dismutase (SOD): Marklund, 1985.
- Glutathiona Peroxidase (GPx): Wendel, 1981.
- Glutathiona Redutase (GR): Calberg e Manervick, 1985.
- Glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD): Tian, 1998.
- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS): Ohkawa 1979.
- Conteúdo de carbonilas:(Reznick e Packer 1994).
- Oxidação do 2'7' diclorofluoresceína (DCFH) : Lebel, 1992).
- Proteínas: Lowry, 1951.

A análise estatística foi realizada por a Análise de Variância de uma via (ANOVA), seguido de teste de Tukey para  $P < 0,05$ .

## Resultados

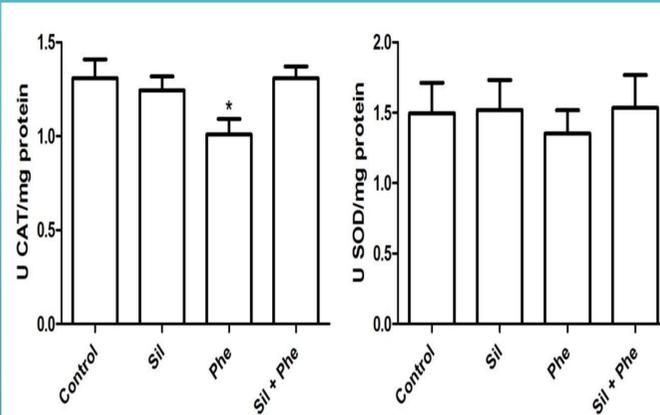


Fig. 3. Efeito *in vivo* da silibinina (Sil) nas atividades de catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em córtex cerebral de ratos submetidos a HPA. Resultados em média  $\pm$  SD (n=6-10). \* $p < 0,05$  comparado ao controle (Tukey test).

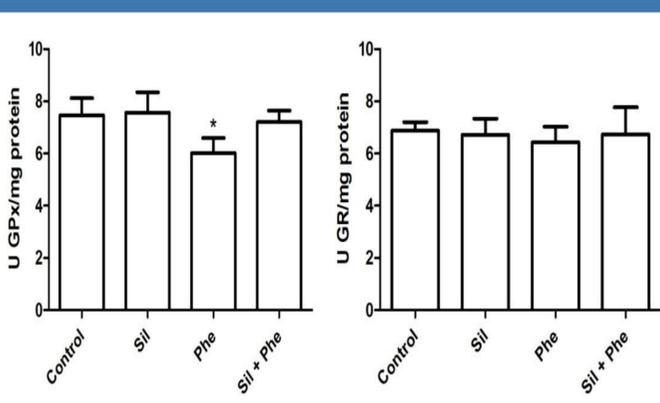


Fig. 4. Efeitos *in vivo* da silibinina (Sil) nas atividades de glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR) em córtex cerebral de ratos submetidos a HPA. Resultados em média  $\pm$  SD (n=6-10). \* $p < 0,05$  comparado ao controle (Tukey test).

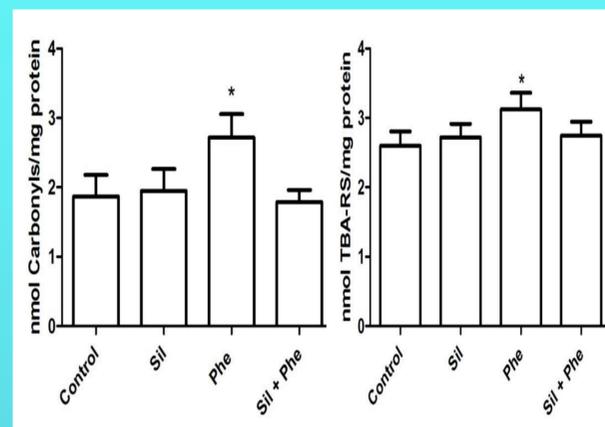


Fig. 5. Efeitos *in vivo* da silibinina (Sil) em carbonilas e na produção de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos submetidos a HPA. Resultados em média  $\pm$  SD (n=6-10). \* $p < 0,05$  comparado ao controle (Tukey test).

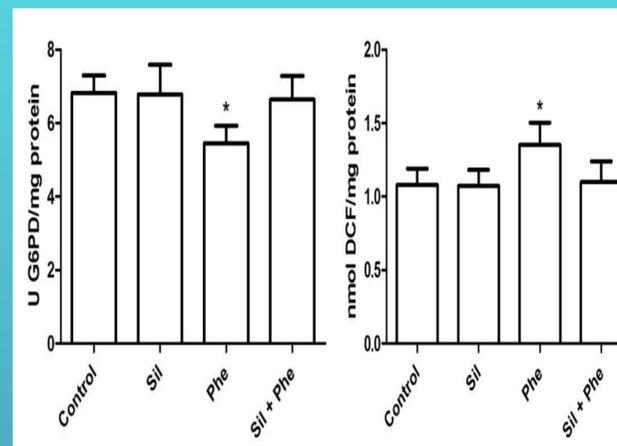


Fig. 6. Efeitos *in vivo* da silibinina (Sil) nas atividades de : glucose-6-phosphate desidrogenase (G6PD) e produção de espécies reativas (DCF) em córtex cerebral de ratos submetidos a HPA. Resultados em média  $\pm$  SD (n=6-10). \* $p < 0,05$  comparado ao controle (Tukey test)

## Conclusões

Nesse estudo foi investigado o efeito da Sil *in vivo* contra o estresse oxidativo em um modelo agudo de HPA córtex cerebral de ratos Wistar jovens. A Sil foi capaz de prevenir as alterações provocadas pelo modelo de HPA em algumas defesas antioxidantes enzimáticas (CAT, GPx e G6PD), no dano oxidativo a proteínas (carbonilas), na peroxidação lipídica (TBA-RS) e na produção inespecífica de espécies reativas (DCF). O modelo agudo de PKU não provocou alterações nas atividades enzimáticas da SOD e da GR e o tratamento com Sil não alterou esses parâmetros. Os resultados apresentados indicam que a Sil pode ser útil como terapia coadjuvante para o tratamento de PKU, em adição a dieta de restrição à fenilalanina, fornecendo uma potencial melhoria no status redox dos pacientes

## Referências

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265-275
- 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
- Marklund SL (1985) Pyrogallol Autoxidation. In: Greenwald RA (ed) Handbook of methods for oxygen radical research, pp 243-247
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 95:351-358
- Reznick AZ, Packer L (1994) Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. Meth Enzymol 233:357-363
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. Meth Enzymol 105:121-126
- Calberg I, Manervick B (1985) Glutathione reductase. Meth Enzymol 113:484-490
- Tian WN, Pignatelli 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