

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Investigação de parâmetros de estresse oxidativo na urina de pacientes
fenilcetonúricos tratados**

Daiane Grigolo Bardemaker Rodrigues

Porto Alegre, Novembro de 2011.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Investigação de parâmetros de estresse oxidativo na urina de pacientes
fenilcetonúricos tratados**

Daiane Grigolo Bardemaker Rodrigues

Trabalho de Conclusão da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

Prof^a. Dra. Carmen Regla Vargas

Orientadora

Dra. Angela Sitta

Co-orientadora

Porto Alegre, Novembro de 2011.

RESUMO

Introdução: A fenilcetonúria, um erro inato do metabolismo, é caracterizada bioquimicamente pela ausência ou deficiência da atividade da enzima hepato-específica fenilalanina hidroxilase (responsável pela hidroxilação da fenilalanina em tirosina) ou em casos mais raros, pela deficiência de seu co-fator tetrahidrobiopterina. As principais manifestações clínicas da fenilcetonúria correspondem a alterações neurológicas. Embora muitos estudos venham sendo conduzidos, as bases bioquímicas do retardo mental ainda permanecem obscuros. Nos últimos anos, têm-se investigado o papel do estresse oxidativo no dano neuronal em pacientes e em modelos animais, que seria causado por metabólitos e/ou alteração do sistema antioxidante.

Objetivo: Verificar parâmetros de estresse oxidativo na urina de pacientes fenilcetonúricos tratados e correlacionar esses parâmetros como os níveis de fenilalanina sanguíneos.

Métodos: Foram analisadas amostras de urina ocasionais e plasma de 9 pacientes fenilcetonúricos tratados e 6 de indivíduos controles saudáveis. Os parâmetros bioquímicos avaliados foram: determinação dos níveis de fenilalanina no plasma, determinação de 15-F_{2t}-isoprostanos na urina, determinação de di-tirosina na urina, determinação da capacidade antioxidante urinária.

Resultados: Os níveis de isoprostanos, um biomarcador de dano oxidativo a lipídeos, e os níveis de di-tirosina, um biomarcador de dano oxidativo a proteínas, estavam significativamente aumentados quando comparados ao grupo controle. Além disso, foi observado uma correlação significativa positiva entre os níveis sanguíneos de fenilalanina e os níveis urinários de di-tirosina dos pacientes em relação ao grupo controle. Adicionalmente, a medida da capacidade antioxidante urinária dos pacientes fenilcetonúricos mostrou-se diminuída em relação ao grupo controle.

Discussão: O aumento observado de isoprostanos na urina é um importante indicador de dano oxidativo a lipídios. A peroxidação lipídica pode levar ao dano celular e gerar radicais potencialmente tóxicos. Adicionalmente, o aumento dos níveis de di-tirosina observado demonstra dano oxidativo a proteínas, reforçando assim que esse desequilíbrio pode estar envolvido na fisiopatogenia da fenilcetonúria. Ainda, foi observado uma correlação positiva entre o dano oxidativo a proteínas e os níveis de fenilalanina sanguíneos. A diminuição da capacidade antioxidante urinária dos pacientes fenilcetonúricos pode estar relacionado a dieta de restrição protéica a qual são submetidos.

Conclusões: Em conclusão, os resultados deste trabalho permitem reforçar o envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatogenia da fenilcetonúria e reforçar a importância de prevenir o dano oxidativo a lipídeos e a proteínas através de terapias alternativas com antioxidantes, especialmente para pacientes sob dieta de restrição protéica.

Palavras-chave: Fenilcetonúria; estresse oxidativo; radicais- livres

" Este artigo foi elaborado segundo as normas da Revista HCPA em anexo"

**INVESTIGAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NA URINA DE PACIENTES
FENILCETONÚRICOS TRATADOS**

Estresse Oxidativo em Urina

INVESTIGATION OF OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN URINE OF TREATED PHENYLKETONURIC
PATIENTS

Daiane Grigolo Bardemaker Rodrigues^{1,2}, Carmen Regla Vargas^{2,3}

¹ Graduação da Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

² Serviço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre, RS, Brasil

³ Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

Trabalho realizado no Serviço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre, RS, Brasil

Correspondência autor: crvargas@hcpa.ufrgs.br (Carmen Regla Vargas)

RESUMO

Introdução: A fenilcetonúria, um erro inato do metabolismo, é caracterizada bioquimicamente pela ausência ou deficiência da atividade da enzima hepato-específica fenilalanina hidroxilase (responsável pela hidroxilação da fenilalanina em tirosina) ou em casos mais raros, pela deficiência de seu co-fator tetrahidrobiopterina. As principais manifestações clínicas da fenilcetonúria correspondem a alterações neurológicas. Embora muitos estudos venham sendo conduzidos, as bases bioquímicas do retardo mental ainda permanecem obscuros. Nos últimos anos, têm-se investigado o papel do estresse oxidativo no dano neuronal em pacientes e em modelos animais, que seria causado por metabólitos e/ou alteração do sistema antioxidante.

Objetivo: Verificar parâmetros de estresse oxidativo na urina de pacientes fenilcetonúricos tratados e correlacionar esses parâmetros como os níveis de fenilalanina sanguíneos.

Métodos: Foram analisadas amostras de urina ocasionais e plasma de 9 pacientes fenilcetonúricos tratados e 6 de indivíduos controles saudáveis. Os parâmetros bioquímicos avaliados foram: determinação dos níveis de fenilalanina no plasma, determinação de 15-F_{2t}-isoprostanos na urina, determinação de di-tirosina na urina, determinação da capacidade antioxidante urinária.

Resultados: Os níveis de isoprostanos, um biomarcador de dano oxidativo a lipídeos, e os níveis de di-tirosina, um biomarcador de dano oxidativo a proteínas, estavam significativamente aumentados quando comparados ao grupo controle. Além disso, foi observado uma correlação significativa positiva entre os níveis sanguíneos de fenilalanina e os níveis urinários de di-tirosina dos pacientes em relação ao grupo controle. Adicionalmente, a medida da capacidade antioxidante urinária dos pacientes fenilcetonúricos mostrou-se diminuída em relação ao grupo controle.

Discussão: O aumento observado de isoprostanos na urina é um importante indicador de dano oxidativo a lipídios. A peroxidação lipídica pode levar ao dano celular e gerar radicais potencialmente tóxicos. Adicionalmente, o aumento dos níveis de di-tirosina observado demonstra dano oxidativo a proteínas, reforçando assim que esse desequilíbrio pode estar envolvido na fisiopatogenia da fenilcetonúria. Ainda, foi observado uma correlação positiva entre o dano oxidativo a proteínas e os níveis de fenilalanina sanguíneos. A diminuição da capacidade antioxidante urinária dos pacientes fenilcetonúricos pode estar relacionado a dieta de restrição protéica a qual são submetidos.

Conclusões: Em conclusão, os resultados deste trabalho permitem reforçar o envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatogenia da fenilcetonúria e reforçar a importância de prevenir o dano oxidativo a lipídeos e a proteínas através de terapias alternativas com antioxidantes, especialmente para pacientes sob dieta de restrição protéica.

Palavras-chave: Fenilcetonúria; estresse oxidativo; radicais- livres

ABSTRACT

Introduction: Phenylketonuria (PKU), an inborn error of metabolism, is biochemically characterized by the absence or deficiency of the liver-specific enzyme phenylalanine hydroxylase (responsible for the hydroxylation of phenylalanine to tyrosine) or in rarer cases, by the deficiency of its cofactor tetrahydrobiopterin. The main clinical manifestations of PKU correspond to neurological disorders. Although many studies are being conducted, the biochemical basis of mental retardation remains unclear. In recent years, it has been investigated the role of oxidative stress in neuronal damage in patients and animal models, which would be caused by metabolites and/or alteration of the antioxidant system.

Objective: To verify oxidative stress parameters in urine of patients treated PKU patients and correlate these parameters with phenylalanine blood levels.

Methods: It was analyzed occasional urine samples and plasma of 9 treated PKU patients and 6 healthy control subjects. The biochemical parameters evaluated were: determination of phenylalanine plasma levels, determination of 15 - F2t-isoprostanes in urine, determination of di-tyrosine in urine, determination of urinary antioxidant capacity.

Results: The levels of isoprostanes, a biomarker of oxidative damage to lipids, and the levels of di-tyrosine, a biomarker of oxidative damage to proteins, were significantly increased when compared to the control group. In addition, it was observed a significant positive correlation between phenylalanine blood levels and urinary excretion of di-tyrosine in patients. In addition, the measurement of urinary antioxidant capacity was decreased in PKU patients in relation to controls.

Discussion: The observed increase of isoprostanes in urine is an important indicator of oxidative damage to lipids. Lipid peroxidation can lead to cell damage and generate potentially toxic radicals. Additionally, the increased levels of di-tyrosine observed indicates oxidative damage to proteins, reinforcing that this imbalance may be involved in the pathogenesis of PKU. Moreover, it was observed a positive correlation between the oxidative damage to proteins and phenylalanine blood levels. The decrease of urinary antioxidant capacity in PKU patients may be related to dietary protein restriction to which they are submitted.

Conclusions: In conclusion, the results of this study reinforce the involvement of oxidative stress in the pathogenesis of PKU and the importance of preventing oxidative damage to lipids and proteins by alternative therapies with antioxidants, especially for patients on protein-restricted diet.

Keywords: Phenylketonuria; oxidative stress; Free radical

INTRODUÇÃO

A Fenilcetonúria ("Phenylketonuria" - PKU) está classificada dentro dos erros inatos do metabolismo (EIM) e apresenta herança autossômica recessiva, o que significa um risco de recorrência para a prole de 25%. A doença é caracterizada bioquimicamente pela ausência ou deficiência da atividade da enzima hepato-específica fenilalanina hidroxilase ("Phenylalanine hidroxilase"- PAH), enzima esta que catalisa a hidroxilação da L-fenilalanina ("Phenylalanine"- Phe) a tirosina ("Tyrosine" - Tyr) ou, em casos mais raros, pela deficiência de seu cofator, a tetrahydrobiopterina (BH₄) (1). Na condição causada pela deficiência na PAH, os níveis sanguíneos de Phe de pacientes não tratados são frequentemente maiores que 10 mg/dL e a atividade enzimática é menor do que 1% do normal (2). Devido ao bloqueio da rota metabólica, ocorre uma diminuição da concentração do produto Tyr, que por sua vez é responsável pela biossíntese de alguns neurotransmissores como dopamina e norepinefrina (1). Além disso, há a ocorrência de reações paralelas, como a transaminação da Phe com o piruvato produzindo assim o fenilpiruvato ("Phenylpiruvate" -PPA), e outros metabólitos anormais, como fenilacetato e fenilactato, que se acumulam no sangue e tecidos dos pacientes fenilcetonúricos (3). Esses metabólitos são excretados em níveis elevados na urina dos pacientes. O tratamento dos pacientes PKU consiste em dieta hipoprotéica suplementada com uma fórmula de aminoácidos isenta de Phe.

Embora a PHA seja uma enzima hepática, as principais manifestações clínicas da PKU correspondem a alterações neurológicas. Quase a totalidade dos pacientes PKU não tratados apresentam retardo mental grave. O peso cerebral dos pacientes é inferior ao de pessoas saudáveis, além de apresentarem defeitos na mielinização e reflexos hiperativos (4). Adicionalmente, as concentrações elevadas de Phe parecem influenciar diversos mecanismos cerebrais como a excitabilidade neural, a condução axonal e a velocidade de condução sináptica (5). Foi demonstrado também que a atividade da Na⁺, K⁺- ATPase está reduzida na membrana sináptica em modelos animais de PKU (6). Também há estudos que demonstram que a toxicidade da PKU pode ser atribuída as altas concentrações de Phe, que compartilha sistemas de transporte com outros aminoácidos neutros, dificultando assim a passagem através das membranas celulares e barreira hematoencefálica (BHE). Esse desequilíbrio entre o plasma e o meio intracelular pode levar a formação de proteínas anormais resultando em proliferação dendrítica e mielinização defeituosa (7). Embora muitos estudos venham sendo conduzidos, as bases bioquímicas do retardo mental na PKU ainda permanecem obscuras (4). Nos últimos anos, têm-se investigado o papel do estresse oxidativo no dano neuronal em pacientes e em modelos animais, que seria causado por metabólitos e/ou por alterações do sistema antioxidante (7, 8).

As espécies reativas do oxigênio (ROS) são continuamente produzidas durante eventos fisiológicos normais e, quando produzidos em excesso, são capazes de iniciar facilmente uma cascata de eventos deletérios. No entanto, os organismos possuem um eficiente sistema antioxidante que incluem defesas enzimáticas como por exemplo a superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase, como também defesas não-enzimáticas (8). O termo estresse oxidativo refere-se ao desequilíbrio entre a capacidade antioxidante e as espécies reativas formadas, podendo dessa forma resultar em dano oxidativo a componentes celulares (9,10). Dessa maneira, as consequências do estresse oxidativo incluem a lipoperoxidação na membrana celular, a oxidação de proteínas, lesões ao DNA e a morte celular, dependendo do tipo celular e da severidade do estresse oxidativo (9, 10). Acredita-se que os radicais livres estão envolvidos em um grande número de doenças humanas. Crescentes evidências têm demonstrado que o dano causado pelos radicais livres tem uma importante contribuição em doenças como inflamação crônica, vascular, doenças neoplásicas e neurodegenerativas como doença de Parkinson, Alzheimer, esclerose múltipla etc. Além disso, o cérebro tem baixas concentrações de defesas antioxidantes e alto conteúdo de lipídeos, principalmente ácidos graxos insaturados e catecolaminas, que são muito susceptíveis a reações de oxidação (1).

O estresse oxidativo é comumente observado em EIM intermediário. No entanto, este processo, nessas doenças, não está completamente esclarecido, mas acredita-se ser devido ao acúmulo de metabólitos tóxicos que levam a excessiva produção de radicais livres. Aliado a isso, o aumento substancial de metabólitos, pode levar a uma depleção, direta ou indiretamente, da capacidade antioxidante da célula (11).

Recentes estudos demonstraram que o estresse oxidativo pode desempenhar um importante papel na patogenia da PKU, desde que alguns parâmetros de peroxidação lipídica e *status* antioxidante mostraram-se significativamente alterados em plasma e eritrócitos dos pacientes (11). Dessa forma, o presente estudo tem por objetivo verificar parâmetros de estresse oxidativo na urina de pacientes PKU tratados e correlacionar esses parâmetros com os níveis sanguíneos de Phe.

MÉTODOS

Pacientes e controles

Os pacientes que participaram desse estudo foram oriundos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil. Amostras de urina ocasional e de sangue venoso para separação de plasma foram obtidas de 9 (nove) pacientes com PKU clássica com idades entre 10 e 22 anos de idade, em tratamento de restrição protéica e fórmula sintética de aminoácidos. O grupo controle consistiu da urina de 6 (seis) indivíduos saudáveis com idades correspondentes aos pacientes. As amostras de urina e plasma foram congeladas a - 80 °C até o momento da análise. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil. Os responsáveis pelos pacientes assinaram o termo de consentimento esclarecido.

Determinação dos níveis de Phe em plasma

Os níveis de Phe do plasma foram medidos através de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC Modelo: LC-10 AXL, fabricante Shimadzu Corporation, Japan) usando coluna de fase reversa. Inicialmente, 50 µL de plasma foram desproteinizados com 200 µL de metanol. Após centrifugação, a 40 µL do sobrenadante foi adicionado 10µL de padrão interno (ácido homocisteico) e 50µL de mercaptoetanol 4%. A amostra foi derivatizada com o-ftaldialdeído e foi quantificada por fluorescência. O tempo de retenção do padrão interno e da fenilalanina foram de 7 e 42 minutos respectivamente. A calibração foi realizada por um *pool* de aminoácidos. Os resultados foram expressos como µmol/L (12).

Determinação de 15-F2t- isoprostanos na urina

Isoprostanos são compostos semelhantes as prostaglandinas que resultam da peroxidação de lipoproteínas, mediada por radicais livres. Devido a curta meia-vida, esses produtos são eliminados principalmente na urina (13, 14). As urinas foram descongeladas e os níveis de isoprostanos foram determinados utilizando-se enzima-imunoenensaio (Elisa, Oxford Biomedical Research EA85). As amostras foram misturadas a um tampão de diluição e agitadas em vórtex para eliminar interferentes que podem ligar-se inespecificamente a placa. Nesse ensaio, o 15-F2t- isoprostano presente na amostra compete com o 15-F2t- isoprostano conjugado à enzima peroxidase (HRP) para ligar-se a um anticorpo policlonal específico para 15-F2t-isoprostano fixado na placa. Quando o substrato da enzima é adicionado, ocorre formação de um derivado corado, cuja a intensidade da coloração é proporcional à quantidade de isoprostanos marcados ligados ao anticorpo e inversamente proporcional à quantidade de isoprostanos na amostra ou padrões. O resultado é expresso em nanogramas de isoprostanos por miligramas de creatinina na urina.

Determinação de di-tirosina na urina

O conteúdo de di-tirosina, uma medida de oxidação protéica, foi determinada por autofluorescência. Para a determinação da di-tirosina fluorescente, à 50 µl de urina descongeladas foi adicionado 950 µl de uréia 6 mol/L em tampão fosfato de sódio 20 mmol/L pH 7.4. Após 30 min, a concentração de di-tirosina foi medida utilizando-se um fluorímetro (excitação 315nm e emissão 410 nm). Os resultados foram expressos em unidades de fluorescência por mg de creatinina na urina (15).

Determinação da capacidade antioxidante urinária

A capacidade antioxidante urinária foi determinada utilizando-se um Kit de ensaio químico (Antioxidant Assay, Cayman Chemical, 709001). Este ensaio baseia-se na capacidade dos antioxidantes presentes na amostra de inibir a oxidação do ABTS (2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina sulfonato) pela metamioglobina. A quantidade de ABTS oxidada pode ser medida pela detecção da absorbância a 405 nm. Os antioxidantes presentes na amostra causam uma supressão da absorbância que é proporcional a sua concentração. A capacidade dos antioxidantes da amostra de prevenir a oxidação do ABTS é comparada a do trolox, um tocoferol análogo solúvel em água, permitindo dessa forma avaliar o estado antioxidante urinário, que é expresso em equivalente μ molar de trolox por mg de creatinina urinária.

Análise estatística

Os dados foram expressos em média \pm desvio-padrão. A comparação entre as médias foi analisada por teste t não pareado. A correlação entre as variáveis foi calculada usando o Coeficiente de Correlação de Pearson. Valor de p menor que 0,05 foi considerado significativo. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) software, versão 15.0 em PC- compatível.

RESULTADOS

Neste estudo foram avaliados parâmetros de estresse oxidativo na urina de pacientes fenilcetonúricos. Os parâmetros de dano oxidativo a lipídeos (níveis de isoprostanos) e a proteínas (níveis de di-tirosina) bem como a capacidade antioxidante urinária foram comparadas a um grupo controle. Aliado a isso, foram correlacionados os níveis de fenilalanina sanguíneos dos pacientes PKU com os níveis urinários de di-tirosina.

Primeiramente foi verificado que os níveis de isoprostanos, um produto final da peroxidação do ácido araquidônico e os níveis de di-tirosina que é um biomarcador de dano oxidativo a proteínas estavam significativamente aumentados quando comparados ao grupo controle ([$t(17)=3,924$, $p < 0,05$] e [$t(17)=2,165$, $p < 0,05$], respectivamente). Fig. 1a, 1b .

Também foi verificada a capacidade antioxidante urinária dos pacientes PKU. Os resultados demonstraram que os pacientes PKU apresentam uma diminuição desse parâmetro em relação ao grupo controle [$t(13)=2,927$, $p < 0,05$]. Fig. 1c.

Além disso, na correlação entre os níveis de fenilalanina do plasma com os níveis de di-tirosina da urina dos pacientes PKU observou-se uma correlação significativa positiva ($r = 0,538$, $p < 0,05$) entre esses parâmetros. Fig. 2.

DISCUSSÃO

A PKU é um dos mais comuns EIM apresentando uma frequência de 1:14.000 nascidos, sendo uma doença autossômica recessiva caracterizada pela deficiência severa da enzima fenilalanina hidroxilase, enzima responsável pela conversão do aminoácido Phe a Tyr (16). Devido ao bloqueio desta rota metabólica ocorre um acúmulo do aminoácido Phe nos fluidos biológicos e tecidos (hiperfenilalaninemia) assim como a produção de metabólitos tóxicos, como fenilpiruvato, fenilactato e fenilacetato.

Os pacientes PKU não tratados apresentam principalmente danos neurológicos, como retardo no desenvolvimento mental e baixa capacidade intelectual, sintomas esses irreversíveis.

Embora sintomas neurológicos sejam característicos de pacientes PKU com elevados níveis de Phe no plasma, os mecanismos envolvidos no dano tecidual nesta desordem não estão completamente elucidados. Recentemente, foi demonstrado que o estresse oxidativo ocorre em vários EIM (17).

Radicais livres são produzidos normalmente no organismo. No entanto, o excesso desses compostos, seja por um aumento de sua produção e/ou diminuição das defesas antioxidantes, leva a distúrbios em sistemas enzimáticos, transporte de membranas, função do DNA entre outros, como resultado de dano oxidativo a proteínas e a lipídios (10).

Nesse contexto, têm sido demonstrado que o estresse oxidativo pode contribuir, pelo menos em parte, na disfunção neurológica severa em alguns pacientes PKU (18). Dessa forma, no presente estudo foram investigados parâmetros de estresse oxidativo na urina desses pacientes.

Foi observado um aumento significativo de isoprostanos na urina dos pacientes PKU. Os isoprostanos são compostos semelhantes as prostaglandinas cuja produção é mediada por radicais livres através da peroxidação de ácidos graxos *in vivo* e pode ser medido em fluidos biológicos. Sendo assim, a medida de isoprostanos urinários é um importante indicador de dano oxidativo a lipídios (19, 20). Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores que demonstraram dano a lipídeos, através de outros parâmetros de estresse oxidativo medidos em plasma de pacientes PKU, como espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) que reflete a quantidade de malondialdeído formado, um produto final da peroxidação de ácidos graxos de membrana (8). A peroxidação lipídica pode levar ao dano celular de diversas estruturas por alteração de integridade, fluidez, permeabilidade e perda funcional de membranas biológicas, modificando lipoproteínas de baixa densidade e gerando radicais potencialmente tóxicos (21).

Adicionalmente, observou-se um aumento significativo dos níveis de di-tirosina na urina dos pacientes PKU, quando comparado aos controles. A medida da formação de di-tirosina indica dano oxidativo a proteínas, tendo em vista que sua formação tem origem da oxidação em resíduos de tirosina em proteínas adjacentes, ocorrendo assim a formação de uma ligação inter-fenólica altamente estável e que não mais é metabolizada (15). Dessa maneira, nossos resultados demonstraram que os pacientes PKU apresentam dano oxidativo a proteínas corroborando com estudos anteriores que encontraram dano a proteínas através de parâmetros de estresse oxidativo, como aumento da formação de proteínas carboniladas e grupamentos sulfidrilas, medidos em plasma de pacientes PKU (8), reforçando assim que o dano oxidativo a proteínas pode estar envolvido na fisiopatogenia dessa doença. Ainda, foi correlacionado nos pacientes PKU desse estudo, os níveis de Phe encontrados no plasma com os níveis de di-tirosina encontrados na urina. Observou-se uma correlação significativa positiva, sugerindo, assim, que o dano oxidativo a proteínas está relacionado aos níveis de Phe.

Além dos parâmetros de dano oxidativo a lipídios e a proteínas, foi verificada a capacidade antioxidante na urina dos pacientes PKU. Observou-se uma diminuição significativa desse parâmetro quando comparados aos controles. Essa acentuada diminuição pode estar relacionada ao fato de que pacientes PKU são submetidos a dieta de restrição protéica, o que resulta em uma deficiência de vitaminas e micronutrientes envolvidos nas defesas antioxidantes. Estudos anteriores demonstraram a redução dessa capacidade antioxidante no plasma de pacientes sob dieta de restrição protéica portadores de diversos EIM como Doença na Urina do Xarope do Bordo (MSUD) (22), Acidemias Metilmalônica e Propiônica (13) e Homocistinúria (23).

Em estudos anteriores, foi demonstrado que altos níveis de Phe interferem na produção de alguns neurotransmissores como dopamina e noradrenalina além de diminuir a disponibilidade de triptofano e tirosina, levando a uma depleção de serotonina e catecolaminas influenciando na função cerebral (21). Além disso, altas concentrações de Phe influenciam diversos mecanismos da função cerebral, bem como excitabilidade neuronal, condução axonal e velocidade de transmissão sináptica (1,6,7).

Sabe-se que todos os tecidos humanos são suscetíveis ao dano oxidativo, em especial o tecido cerebral, pois há um alto consumo de oxigênio. Além disso, devido a grande quantidade de lipídios poliinsaturados presentes nas membranas neuronais, o cérebro torna-se um alvo mais fácil à ocorrência de lipoperoxidação. Também cabe ressaltar a baixa quantidade de defesas antioxidantes presentes no cérebro, o que o torna mais suscetível ao estresse oxidativo.

CONCLUSÃO

Em conclusão, esses resultados obtidos em urina de pacientes PKU, corroborando com os resultados similares encontrados em plasma, reforçam o envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatogenia desta desordem. Ainda, estes resultados mostram a importância de prevenir o dano oxidativo a lipídeos e a proteínas através de terapias alternativas, como reposição de compostos antioxidantes, especialmente em pacientes sob dieta de restrição protéica. Adicionalmente, esses resultados mostram que a urina, uma matriz de fácil coleta e não invasiva, pode ser usada para monitorar parâmetros de estresse oxidativo em pacientes PKU.

AGRADECIMENTOS

À Professora Carmen, querida orientadora, que com sua competência e disposição permitiram a realização deste trabalho de forma tranquila e agradável.

À Angela, minha co-orientadora por toda ajuda e disposição.

Aos colegas do laboratório de Análise de Metabólitos do Serviço de genética Médica do HCPA, pelos bons momentos que passamos juntos.

Ao Serviço de Genética Médica do HCPA, por possibilitar que o trabalho fosse desenvolvido.

Aos pacientes que fizeram parte deste estudo.

À minha família, pelo carinho e incentivo.

À Deus, pela proteção.

REFERÊNCIAS

1. Sirtori L, Dutra Filho C, Fitarelli D, Sitta A, Haeser A, Barschak A, et al. Oxidative Stress in Patients with Phenylketonuria. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1740:68-73.
2. Smith I, Lee P. The hyperphenylalaninemias. In Fernandes I, Saudabray IM, Vander Berghe G, editors. *Inborn Metabolic Diseases*. 3th ed. Springer; 2000. p. 171-179.
3. Lehninger AL. *Principles of Biochemistry*. 4th ed. New York: Freeman and Company; 2004. p. 656-689.
4. Scriver CR, Kaufman S, Eisensmith RC, Woo SLC. Hyperphenylalaninemias. In: Scriver SR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed. New York: MC Graw-Hill; 2001. p. 1667-1724.
5. Sitta A. *Investigação do estresse oxidativo em pacientes com fenilcetonúria não tratados e durante o tratamento dietético [dissertação]*. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul.; 2007.
6. Wyse A, Sarkis J, Cunha Filho J, Teixeira M, Schetinger M, Wajner M, et al. Effect of Phenylalanine and its Metabolites on ATP Diphosphohydrolase Activity in Synaptosomes from Rat Cerebral Cortex. *Neuro res*. 1994; 19: 1175-1180.
7. Vargas C, Wajner M, Sitta A. Oxidative Stress in Phenylketonuric Patients. *Mol Genet Metab*. 2011; doi:10.1016/j.ymgme.2011.07.010
8. Sitta A, Vanzin C, Biancini G, Manfredini V, Oliveira A, Vargas C, et al. Evidence that L-Carnitine and Selenium Supplementation Reduces Oxidative Stress in Phenylketonuric Patients. *Cell Mol Neurobiol*. 2011; 31:429-436.
9. Halliwell B. Role of Free Radicals in the Neurodegenerative Diseases. *Drugs Aging*. 2001; 18: 685-716
10. Halliwell B, Gutteridge J, *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press. 2007
11. Sitta A, Barschak A, Deon M, Terroso T, Pires R, Vargas C, et al. Investigation of Oxidative Stress Parameters in Treated Phenylketonuric Patients. *Met Brain Dis*. 2006; 21:287-296.
12. Joseph MH, Marsden CA. Amino acids and small peptides. In: Lim CK, editor. *HPLC of Small Peptides*. Oxford: IRL Press.1986; p.13-27.
13. Ribas G, Biancini G, Mescka C, Wayhs C, Sitta A, Vargas C et al. Oxidative Stress Parameters in Urine from Patients with Disorders of Propionate Metabolism: a Beneficial Effect of L-Carnitine Supplementation. *Cell Mol Neurobiol*. 2011; DOI 10.1007/s10571-011-9736-8
14. Miller E, Mrowicka M, Saluk-Juszczak J, Ireneusz M. The Level of Isoprostanes as a Non- invasive Marker for in Vivo Lipid peroxidation in secondary Progressive Multiple Sclerosis. *Neurochem Res*. 2001; 36:1012-1016.
15. Kirschbaum B. Correlative studies of urine fluorescence and free radical indicator. *Clin Nephrol*. 2002; 58: 344-349.
16. Mazzola P, Terra M, Rosa Andrea, Meska C, Moraes t, Dutra-Filho C et al. Regular exercise prevents oxidative stress in the brain of hyperphenylalaninemic rats. *Met Brain Dis*. 2011; DOI 10.1007/s11011-011-9264-8
17. Colome C, Sierra C, Vilaseca M. Congenital errors of metabolism : cause of oxidative stress?.*Med Clin*. 2000; 115:111-117.
18. Sierra C, Vilaseca M, Moyano D, Brandi N, Campistol J, Mira A et al. Antioxidant status in hyperphenylalaninemia. *Clin Chim Acta*. 1998; 276:1-9
19. Basu S. Isoprostanes: novel bioactive products of lipid peroxidation . *Free Radic Res*. 2004; 38:105-122.
20. Morrow J. The isoprostanes-unique products of arachidonate peroxidation : their role as mediators of oxidant stress. *Curr Pharm Des*. 2006; 12: 895-902.
21. Greenberg M , Li X, Gu X, Qin J, Salomom R, Hazen S. The lipid Whisker model of the structure of oxidized cell membranes. *J Biol Chem*. 2008; 283: 2385-2396
22. Barschak A, Sitta A, Deon M, Oliveira M, Wajner M, Vargas C, et al. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis*. 2006; 21: 279-286
23. Vanzin C, Biancine G, Sitta A, Wayhs C, Pereira I, Vargas C et al. Experimental evidence of oxidative stress in plasma of homocystinuric patients: A possible role for homocysteine. *Mol Genet Metab*. 2011; 104: 112-117

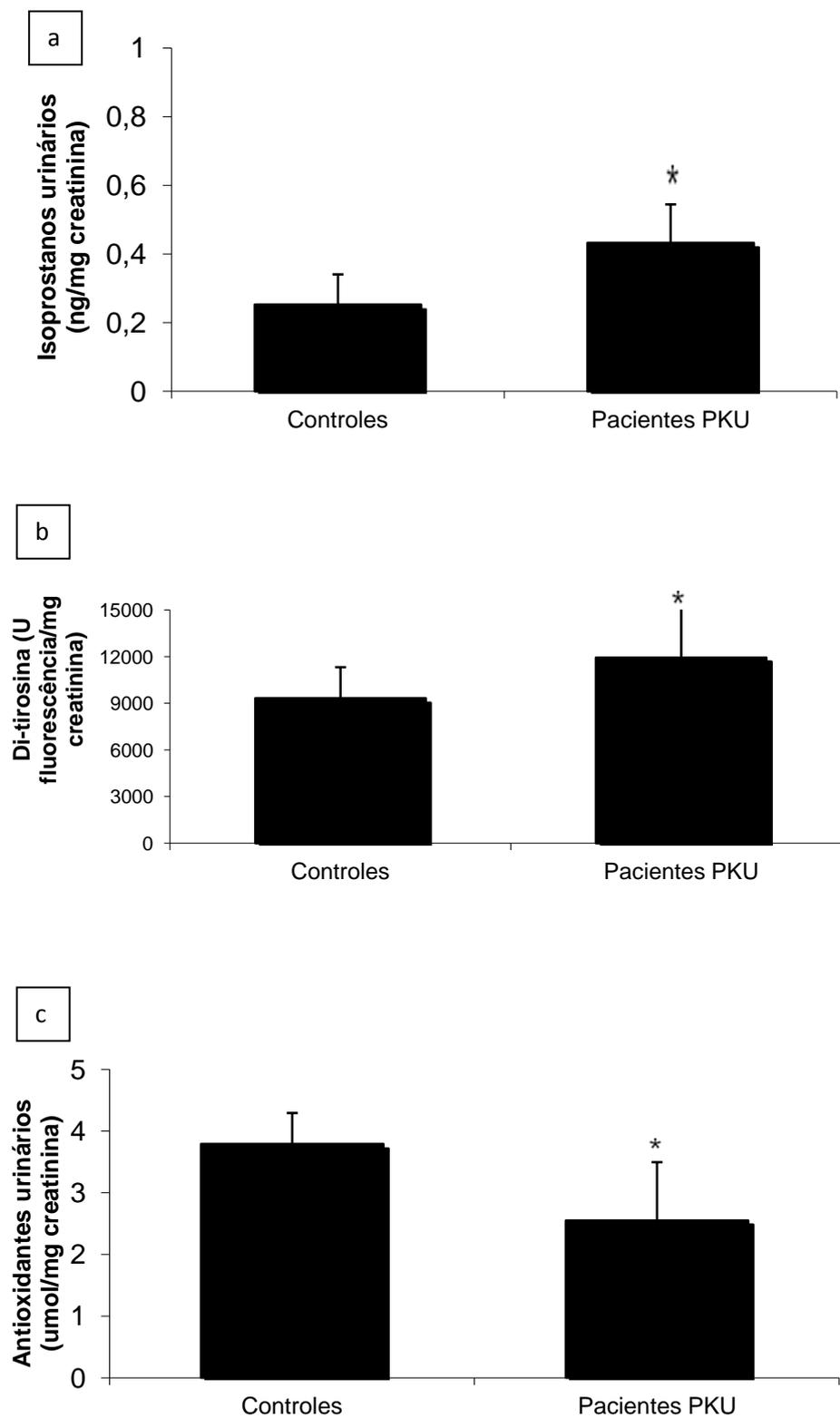


Figura 1. Níveis de Isoprostanos (a), di-tirosina (b) e capacidade antioxidante (c) na urina de pacientes fenilcetonúricos e controles. Dados representam média \pm desvio-padrão (pacientes n=9 e controles n= 6) *p < 0,05 comparado aos controles (test- t não pareado).

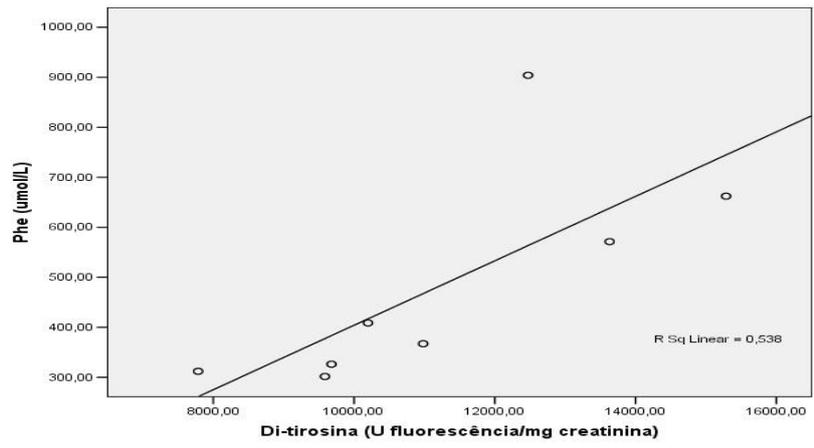


Figura 2. Correlação entre os níveis plasmáticos de Phe e os níveis urinários de di-tyrosina em pacientes PKU.