

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Dano oxidativo induzido por fenilalanina, ácido fenilacético, ácido fenilático e ácido fenilpirúvico em células gliais e em leucócitos: o efeito da L-Carnitina

JÉSSICA LAMBERTY FAVERZANI

PORTO ALEGRE, 2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Dano oxidativo induzido por fenilalanina, ácido fenilacético, ácido fenilático e ácido fenilpirúvico em células gliais e em leucócitos: o efeito da L-Carnitina

Dissertação apresentada por **Jéssica  
Lamberty Faverzani** para obtenção do GRAU  
DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Regla Vargas

Porto Alegre, 2019

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26.03.2019, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Adriana Simon Coitinho  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Carlos Severo Dutra Filho  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Marcelo Dutra Arbo  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

#### CIP - Catalogação na Publicação

Faverzani, Jéssica Lamberty  
Dano oxidativo induzido por fenilalanina, ácido  
fenilacético, ácido fenilalânico e ácido fenilpirúvico  
em células gliais e em leucócitos: o efeito da  
L-Carnitina / Jéssica Lamberty Faverzani. -- 2019.  
121 f.  
Orientadora: Carmen Regla Vargas.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,  
BR-RS, 2019.

1. Fenilcetonúria. 2. estresse oxidativo. 3.  
L-carnitina. 4. fenilalanina. 5. metabólitos. I.  
Vargas, Carmen Regla, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Metabólitos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, na cidade de Porto Alegre, com financiamento da CAPES e do FIPE/HCPA. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.



Aos meus pais, Luiz e Nercina.  
Por muitos motivos, mas principalmente pelo amor e apoio incondicionais.  
Ao Regis. Muito, muito mesmo.





## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Carmen Regla Vargas, por me aceitar em seu grupo de pesquisa. Obrigada por todos os ensinamentos que vão muito além da bancada do laboratório. Minha admiração, respeito e gratidão por tudo.

Ao Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, especialmente a Aline, Verônica e professora Dinara pela colaboração.

À CAPES pela bolsa concedida.

Às minhas eternas “chefas” do Laboratório de Análise de Metabólitos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Angela e Daniella, pela amizade e ensinamentos.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Biomarcadores em Doenças Metabólicas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre: Alana, Bruna, Camila, Carlos, Caroline, Graziela, Maira, Tatiane Hammerschmidt, Tatiane Hauschild e em especial a Desirée e a Marion por toda ajuda. Agradeço a vocês pelo convívio, pelas boas risadas e por dividirem comigo muito mais que conhecimento.

Ao Gilian por toda a ajuda desde a iniciação científica, mas principalmente pela amizade.

A Jéssica Nascimento pela amizade e por dividir comigo a caminhada da graduação e pós-graduação.

Aos amigos que a vida me deu, tenho tanta sorte.

A família Lamberty por dar sentido à palavra “família”, principalmente aos meus primos: Bruna, Christopher, Débora, Felipe, Giséli, Guilherme, Paola e William, irmãos que escolhi.

A família Allendorf pelo incentivo e ao Regis pela parceria, força, por me apoiar e caminhar ao meu lado, mas principalmente pelo amor.

Aos meus irmãos Robson e Karen, por estarem sempre comigo, me protegerem e serem meus melhores amigos. Sou a fã número um de vocês. Aos meus cunhados Daniela e Rafael, por me apoiarem sempre.

Aos meus pais, meus maiores exemplos, por serem meu porto seguro. Amo muito vocês.



“Escolha uma ideia. Faça dessa ideia a sua vida. Pense nela, sonhe com ela, viva pensando nela. Deixe cérebro, músculos, nervos, todas as partes do seu corpo serem preenchidas com essa ideia. Esse é o caminho para o sucesso.”

Swami Vivekananda



## RESUMO

A fenilcetonúria (PKU) é um erro inato do metabolismo dos aminoácidos, causada pela atividade deficiente ou nula da fenilalanina hidroxilase, enzima responsável pela hidroxilação da fenilalanina em tirosina. Como consequência, ocorre o acúmulo da fenilalanina (Phe) e seus metabólitos tóxicos, ácido fenilacético (PAA), ácido fenilpirúvico (PPA) e ácido fenilpirúvico (PLA) no sangue e tecidos dos pacientes fenilcetonúricos. O tratamento para a PKU consiste em uma dieta restrita em Phe e proteínas, suplementada com uma fórmula especial, contendo aminoácidos (exceto Phe), vitaminas e minerais. Apesar dos mecanismos relacionados ao dano neurológico ainda não estarem bem elucidados, estudos vêm mostrando que o acúmulo de metabólitos tóxicos e o estresse oxidativo podem estar relacionados com a fisiopatologia da doença. No presente trabalho, investigamos *in vitro* os efeitos da Phe e seus metabólitos, bem como o efeito da L-carnitina (LC) sobre o dano ao DNA em células gliais C6 e leucócitos de indivíduos saudáveis, a citotoxicidade (através do ensaio vermelho neutro) e a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (através do ensaio da oxidação da diclorofluoresceína - DCF) em células gliais. Demonstramos, pela primeira vez, que a Phe, PAA, PLA e PPA induzem, *in vitro*, dano ao DNA em células gliais e, verificamos que o pré-tratamento *in vitro* com a LC reduz significativamente esse dano. Verificamos também que a Phe e seus metabólitos, *in vitro*, aumentaram o dano ao DNA em leucócitos de indivíduos saudáveis quando comparado ao grupo controle e averiguamos que o co-tratamento com a LC reduz significativamente o dano gerado. Verificamos no ensaio de citotoxicidade que a Phe, PAA, PLA, PPA e LC não prejudicaram a viabilidade celular das células gliais. Observamos aumento da geração de ERO em células gliais induzidas pela Phe, PAA, PLA e PPA quando comparada ao grupo controle e verificamos que o pré-tratamento com LC não reduz as ERO geradas pela PPA e pela maior concentração de PLA nas células gliais. O presente trabalho fornece evidências experimentais de que o dano ao DNA e a geração de ERO podem ser induzidas pela Phe e seus metabólitos e que a LC protege em nível periférico e central contra esse dano, podendo ser considerada como uma terapia adjuvante adequada para evitar danos neurológicos na PKU.

**Palavras-chave:** Fenilcetonúria, Fenilalanina, L-Carnitina, Estresse Oxidativo, Dano ao DNA

## ABSTRACT

Oxidative damage induced by phenylalanine, phenylacetic, phenyllactic and phenylpyruvic acids in glial cells and human peripheral leukocytes: the effect of L-Carnitine

Phenylketonuria (PKU) is an inborn error of amino acid metabolism, caused by deficient or absent of phenylalanine hydroxylase activity, enzyme responsible for hydroxylation of phenylalanine (Phe) to tyrosine. As consequence, the accumulation of phenylalanine (Phe) and its toxic metabolites, phenylacetic (PAA), phenyllactic (PLA) and phenylpyruvic (PPA) acids, in blood and tissues of phenylketonuric patients occurs. The treatment for PKU consists in a Phe and protein-restricted diet, supplemented with a special formula containing amino acids (except Phe), vitamins and minerals. Although the mechanisms related to neurological damage are still poor understood, studies have been shown that the accumulation of toxic metabolites and oxidative stress may be related to the pathophysiology of disease. In the present work, we investigated the *in vitro* effect of Phe and its metabolites, as well as the effect of L-carnitine (LC) on DNA damage in C6 glial cells and white blood cells from healthy individuals, cytotoxicity (by neutral red assay) and reactive oxygen species (ERO) generation (by dichlorofluorescein – DCF - oxidation assay) in glial cells. We demonstrated, for the first time, that *in vitro* effect of Phe, PAA, PLA and PPA in glial cells induced DNA damage and we found that pre-treatment with LC added to glial cells significantly reduces DNA damage. We also verified that *in vitro* effect of Phe and its metabolites increased DNA damage in healthy leukocytes when compared to the control group and we found that co-treatment with LC added to white blood cells from healthy individuals significantly reduces this damage. We verified in cytotoxicity assay that Phe, PAA, PLA, PPA and LC did not impair the cell viability of glial cells. Next, we demonstrated increase in ROS generation in glial cells induced by Phe, PAA, PLA and PPA when compared to the control group and we verified that pre-treatment with LC doesn't reduce the ROS generated by PPA and the higher tested concentration of PLA in glial cells. The present work yields experimental evidence that DNA damage and ROS generation occur and can be induced by Phe and its metabolites and that LC protects at peripheral and central level against this damage

and might be considered as an adjuvant therapy to prevent neurological damage in PKU.

**Keywords:** Phenylketonuria; Phenylalanine; L-carnitine; Oxidative Stress; DNA Damage



## LISTA DE FIGURAS

### 2. Estado da Arte

<b>Figura 1.</b> Rota metabólica de hidroxilação da fenilalanina em tirosina.....	31
<b>Figura 2.</b> Rota alternativa do catabolismo da fenilalanina na fenilcetonúria.....	32
<b>Figura 3.</b> Estrutura química da L-carnitina .....	40

### 4. Capítulo I

<b>Figure 1.</b> Neutral red viability assay in native glial cells treated or not with L-carnitine, phenylalanine and its metabolites.....	77
<b>Figure 2a.</b> DNA damage in native glial cells treated or not with phenylalanine and L-carnitine.....	77
<b>Figure 2b.</b> DNA damage in native glial cells treated or not with phenylacetic acid and L-carnitine.....	78
<b>Figure 2c.</b> DNA damage in native glial cells treated or not with phenyllactic acid and L-carnitine.....	78
<b>Figure 2d.</b> DNA damage in native glial cells treated or not with phenylpyruvic acid and L-carnitine.....	79
<b>Figure 2e.</b> DNA damage in native glial cells treated or not with L-carnitine, phenylalanine, phenylacetic, phenyllactic and phenylpyruvic acids.....	79
<b>Figure 3a.</b> Comet assay in leukocytes of healthy subjects treated or not with phenylalanine.....	80
<b>Figure 3b.</b> Comet assay in leukocytes of healthy subjects treated or not with phenylacetic acid.....	80
<b>Figure 3c.</b> Comet assay in leukocytes of healthy subjects treated or not with phenyllactic acid.....	81
<b>Figure 3d.</b> Comet assay in leukocytes of healthy subjects treated or not with phenylpyruvic acid.....	81
<b>Figure 3e.</b> Comet assay in leukocytes of healthy subjects treated or not with low concentrations of L-carnitine, phenylalanine and its metabolites.....	82

<b>Figure 3f.</b> Comet assay in leukocytes of healthy subjects treated or not with high concentrations of L-carnitine, phenylalanine and its metabolites.....	82
<b>Figure 4a.</b> Reactive oxygen species content in native glial cells treated or not with phenylalanine and L-carnitine.....	83
<b>Figure 4b.</b> Reactive oxygen species content in native glial cells treated or not with phenylacetic acid and L-carnitine.....	83
<b>Figure 4c.</b> Reactive oxygen species content in native glial cells treated or not with phenyllactic acid and L-carnitine.....	84
<b>Figure 4d.</b> Reactive oxygen species content in native glial cells treated or not with phenylpyruvic acid and L-carnitine.....	84
<b>Figure 4e.</b> Reactive oxygen species content in native glial cells treated or not with L-carnitine, phenylalanine and its metabolites.....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 8-OHdG - 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
- BH4 - Tetra-hidrobiopterina
- BHE - Barreira hematoencefálica
- CAT - Catalase
- DCF - Diclorofluoresceína
- DHPR - Di-hidropteridina redutase
- DI – do inglês *damage index* - Índice de dano
- EIM – Erros inatos do metabolismo
- EO – Estresse oxidativo
- ER – Espécies reativas
- ERN – Espécies reativas de nitrogênio
- ERO – Espécies reativas de oxigênio
- G6PD - Glicose-6-fosfato desidrogenase
- GPx – Glutaciona peroxidase
- GR – Glutaciona redutase
- GSH – Glutaciona reduzida
- GSSG – Glutaciona oxidada
- HPA - Hiperfenilalaninemia
- H<sub>2</sub>O - água
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio
- IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 $\beta$
- IL-6 – Interleucina 6
- LC – L-Carnitina
- LNAA - aminoácidos neutros de cadeia longa
- MSUD – do inglês *Maple Syrup Urine Disease* - Doença da urina do xarope do bordo
- O<sub>2</sub> - Oxigênio molecular
- O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - Radical superóxido
- O<sub>2</sub><sup>1</sup> – Oxigênio Singlet
- OH<sup>•</sup> - Radical hidroxil
- Phe - do inglês *Phenylalanine* - Fenilalanina
- PAA – do inglês *phenylacetic acid* - Ácido fenilacético
- PAH – do inglês *phenylalanine hydroxylase* - Fenilalanina hidroxilase

PLA – do inglês *phenyllactic acid* - Ácido fenilático  
PKU - do inglês *Phenylketonuria* - Fenilcetonúria  
PPA – do inglês *phenylpyruvic acid* - Ácido fenilpirúvico  
Q10 - Ubiquinona-10  
RL – Radicais livres  
RMN - ressonância magnética nuclear  
SOD – Superóxido dismutase  
TAS – *Status* antioxidante total  
TAR – Reatividade antioxidante total  
Tyr - do inglês *Tyrosine* - Tirosina

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	23
2. ESTADO DA ARTE .....	237
2.1 Erros Inatos do Metabolismo .....	299
2.1.1 Fenilcetonúria e Hiperfenilalaninemia .....	30
2.1.2 Classificação .....	32
2.1.3 Diagnóstico .....	33
2.1.4 Tratamento .....	34
2.1.5 Manifestações clínicas .....	35
2.1.6 Fisiopatologia .....	36
2.2 Radicais Livres .....	37
2.3 Defesas Antioxidantes .....	38
2.3.1 L-Carnitina .....	40
2.4 Estresse Oxidativo .....	41
2.4.1 Dano ao ácido desoxirribonucléico (DNA) .....	42
2.5 Estresse Oxidativo na Fenilcetonúria .....	43
3. OBJETIVOS .....	47
4. RESULTADOS .....	51
4.1 Capítulo I .....	53
5. DISCUSSÃO .....	87
6. CONCLUSÕES .....	99
REFERÊNCIAS .....	103
ANEXOS .....	1155
ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO: INDIVÍDUOS CONTROLE .....	11717
ANEXO B - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE .....	12021



# 1. INTRODUÇÃO

---





Fenilcetonúria (PKU) é uma aminoacidopatia caracterizada pela deficiência severa ou ausência na atividade da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), que catalisa a hidroxilação da fenilalanina (“phenylalanine” - Phe) em tirosina (“tyrosine” - Tyr) na presença do cofator tetra-hidrobiopterina. Uma vez que a rota de hidroxilação da Phe esteja bloqueada, a Phe e seus metabólitos tóxicos, ácido fenilacético (PAA), ácido fenilpirúvico (PPA) e ácido fenilpirúvico (PPA) também se acumulam no sangue, fluidos e tecidos corporais e posteriormente são excretados em níveis elevados na urina dos pacientes fenilcetonúricos (Scriver e Kaufman, 2001; Nyhan, 1984). Além disso, ocorre a diminuição da concentração do produto Tyr, responsável pela biossíntese de diversos neurotransmissores, como dopamina e norepinefrina (LEHNINGER, 2008; TAM e ROTH, 1997).

A PKU é uma doença de caráter hereditário autossômico recessivo e com uma incidência que varia entre as diferentes nações e os diferentes grupos étnicos do mundo, com prevalência global média estimada de 1:10.000 nascidos vivos (ALBRECHT *et al.*, 2009). No Brasil, a incidência é de aproximadamente 1:24.780 nascimentos (CARVALHO, 2003). Já são mais de 500 mutações descritas no gene que codifica a atividade da enzima PAH, localizado no cromossomo 12 (WOO *et al.*, 1983).

Embora a PAH seja uma enzima hepática, as principais manifestações clínicas da PKU envolvem alterações neurológicas, como retardo mental grave, microcefalia, epilepsia e hiperatividade (SCRIVER e KAUFMAN, 2001). No Brasil, a PKU está entre as doenças que estão incluídas no Programa Nacional de Triagem Neonatal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002), e foi o primeiro EIM incluído em programas de triagem neonatal no mundo. O diagnóstico se dá através da detecção de níveis elevados de Phe no sangue dos pacientes afetados, geralmente através de sangue em papel filtro, bem como por concentrações elevadas de Phe e seus metabólitos (PPA, PAA e PLA) na urina.

O tratamento preconizado para a PKU é baseado numa dieta restrita, com baixo teor de Phe, a fim de reduzir ou normalizar os níveis deste aminoácido, já que o grau de retardo mental está diretamente relacionado com os níveis elevados no plasma e tecidos dos pacientes afetados (SCRIVER e KAUFMAN, 2001). Essa alimentação é geralmente combinada com a administração de uma fórmula especial, livre de Phe, que contém os demais aminoácidos, enriquecida com micronutrientes

essenciais como vitaminas e minerais (PRZYREMBEL e BREMER, 2000; WAPPNER *et al.* 1999).

A L-carnitina (LC) é uma amina quaternária que desempenha um importante papel no metabolismo energético, transportando ácidos graxos de cadeia longa presentes no citosol para a matriz mitocondrial para a síntese de ATP através da  $\beta$ -oxidação (AGARWAL e SAID, 2004). Uma vez que a principal fonte dietética de LC são carne vermelha e laticínios, a deficiência de LC tem sido descrita em pacientes fenilcetonúricos, que são submetidos a uma dieta restrita em proteínas (SITTA *et al.* 2009a; SCHULPIS *et al.*, 1990). Nos últimos anos, algumas fórmulas sintéticas utilizadas no tratamento dos pacientes com PKU têm incluído em sua composição a LC. Além disso, também têm sido atribuída à LC ação antioxidante e antiperoxidativa, além do papel na melhora das funções imunológicas e ela tem sido sugerida como um agente terapêutico para diversas desordens neurodegenerativas (SOLARSKA *et al.*, 2010).

Nos últimos anos muito tem se falado sobre o papel dos radicais livres na fisiopatologia de diversas doenças humanas, especialmente em doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson. Estudos já evidenciaram o papel do estresse oxidativo - caracterizado pelo desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e substâncias pró-oxidantes no organismo - (HALLIWELL e GUTERRIDGE, 2001) na fisiopatogenia de alguns EIM, entre eles as aminoacidopatias, uma vez que o acúmulo de metabólitos tóxicos que acontece nessas doenças pode levar a um aumento excessivo na produção de espécies reativas (BARSCHAK *et al.*, 2006; WAJNER *et al.*, 2004).

Considerando que a fisiopatologia da Fenilcetonúria ainda não é totalmente compreendida, que os pacientes fenilcetonúricos apresentam extensos danos cerebrais com comprometimento neurológico e que o estresse oxidativo parece estar envolvido nesta doença, torna-se de suma importância melhor compreender o efeito *in vitro* da L-Carnitina, composto com ação antioxidante, na doença.

## **2. ESTADO DA ARTE**

---



## 2.1 Erros Inatos do Metabolismo

Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são doenças monogênicas herdadas caracterizadas pela síntese alterada de uma proteína, geralmente uma enzima, com atividade parcial ou totalmente reduzida. Essa síntese errônea resulta no bloqueio da rota metabólica com acúmulo de substratos e seus derivados, bem como diminuição da síntese dos produtos gerados. A repercussão clínica da via afetada é variável, sendo geralmente grave ou letal (SCRIVER *et al.*, 2001).

Em 1908, Archibald Garrod fez a primeira menção ao termo EIM, ao estudar pacientes com alcaptonúria, doença que causa a excreção de ácido homogentísico na urina, deixando-a escura. Garrod avaliou que esta era uma condição rara na população em geral, mas frequente em indivíduos de uma mesma família. Garrod juntamente com Bateson, geneticista inglês, observaram que essa condição durava toda a vida e era transmitida por um padrão de herança autossômica recessiva (CHILDS, VALLE e JIMENEZ-SANCHEZ, 2001). A herança pode ser de três padrões diferentes: autossômica recessiva (maioria dos casos), autossômica dominante ou ligada ao X (SCRIVER *et al.*, 2001).

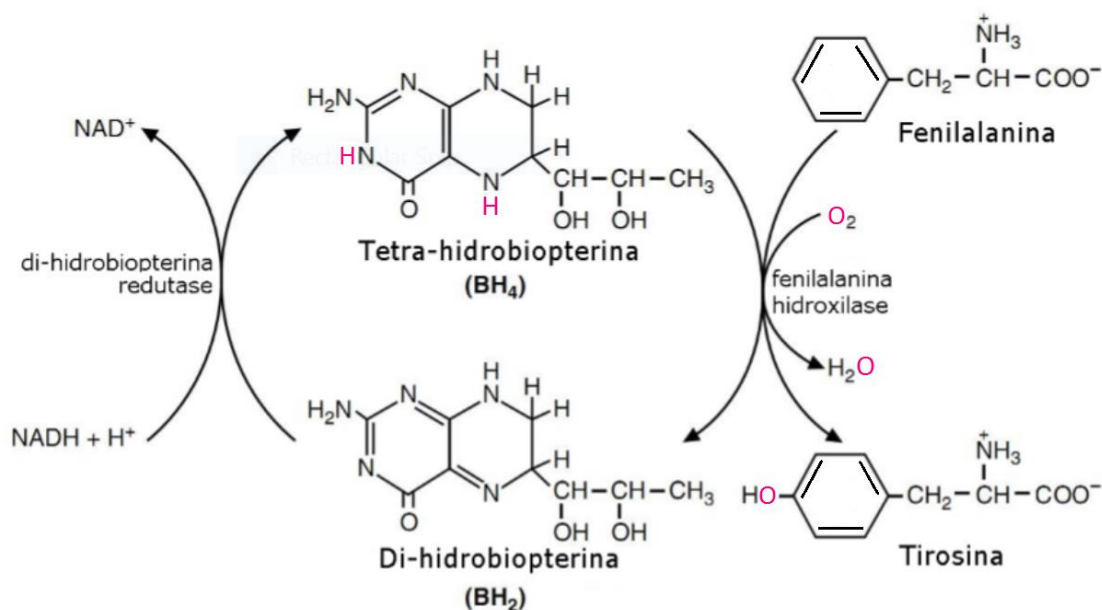
De acordo com o fenótipo clínico dos pacientes, Saudubray e Charpentier (2001), classificaram os EIM em três grandes grupos: o primeiro grupo inclui os distúrbios na síntese ou degradação de moléculas complexas, que incluem as doenças lisossômicas de depósito e as doenças peroxissomais. As doenças pertencentes a este grupo apresentam sintomas permanentes, progressivos e não estão relacionadas com a ingestão de alimentos. O segundo grupo consiste nas doenças com deficiência de energia, que incluem as doenças de depósito de glicogênio, defeitos de gliconeogênese, defeitos de oxidação de ácidos graxos, acidemias lácticas congênitas e doenças mitocondriais de cadeia respiratória. Neste grupo de doenças, os sintomas são causados por deficiência na produção ou utilização de energia. Por fim, o terceiro grupo inclui os erros inatos do metabolismo intermediário, que incluem as aminoacidopatias, as acidemias orgânicas, os defeitos do ciclo da ureia e as intolerâncias aos açúcares. As doenças deste grupo podem levar à intoxicação aguda ou crônica e possuem relação com a ingestão de alimentos. A intoxicação ocorre pelo acúmulo de componentes tóxicos, provenientes do bloqueio das rotas metabólicas.

Aproximadamente, dois terços dos EIM corresponde a aminoacidopatias e acidemias orgânicas e o outro terço aos demais EIM (HOFFMANN, 1994). Apesar de individualmente raros, em conjunto atingem, aproximadamente, um para cada mil nascimentos (SCRIVER *et al.*, 2001). Hoje, sabe-se que estas doenças correspondem cerca de 10% de todos os distúrbios genéticos e compreendem mais de 500 patologias que acometem diversos sistemas e órgãos (CHILDS, VALLE e JIMENEZ-SANCHEZ, 2001).

### 2.1.1 Fenilcetonúria e Hiperfenilalaninemia

A Fenilcetonúria (“phenylketonuria” – PKU) – (OMIM 261600) foi descoberta por Ivar Asbjörn Fölling, em 1934, ao receber em seu laboratório amostras de urina de dois irmãos com atraso mental e um odor corporal estranho. Fölling realizou o teste do cloreto férrico, que em contato com o fenilpiruvato produz cor verde, associando os sintomas neurológicos com a presença desse metabólito da fenilalanina (“phenylalanine” - Phe) na urina, designando essa condição de *imbecillitas phenylpyrouvica*. Anos depois, Lionel Penrose, reconheceu a doença como sendo um novo EIM renomeando-a Fenilcetonúria (CENTERWALL e CENTERWALL, 2000).

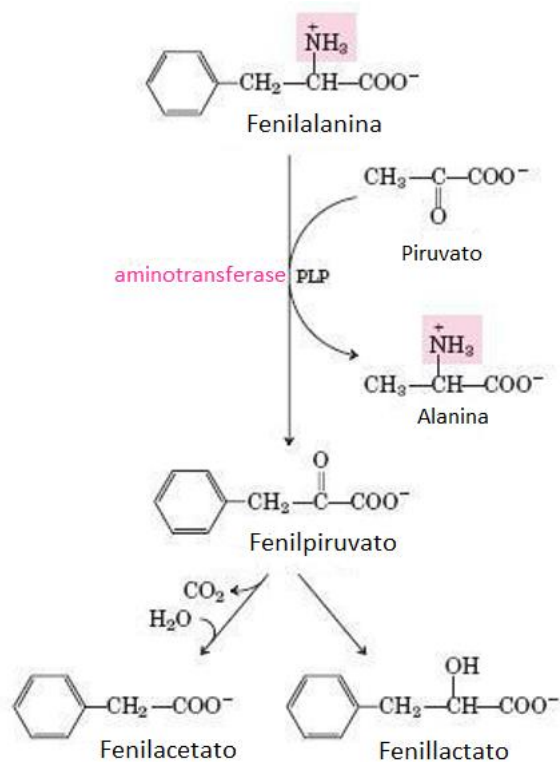
Hiperfenilalaninemia (HPA) é o termo atribuído aos diferentes distúrbios causados pelo aumento persistente dos níveis plasmáticos do aminoácido essencial Phe, decorrente da deficiência de sua enzima hepática. O primeiro passo para o metabolismo da Phe requer a ação da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH – EC 1.14.16.1) responsável pela hidroxilação da Phe em tirosina (“tyrosine” - Tyr), com a participação da coenzima tetra-hidrobiopterina (BH4). A BH4 se reduz na reação de hidroxilação e é regenerada pela enzima di-hidropteridina redutase (DHPR – EC 1.6.99.7) dependente de NADH (SCRIVER e KAUFMAN, 2001), conforme Figura 1.



**Figura 1.** Hidroxilação da fenilalanina em tirosina, pela enzima fenilalanina-hidroxilase, enzima que tem como cofator a tetra-hidrobiopterina. Adaptado de Lehninger, 2008.

Uma vez que a rota de hidroxilação da Phe esteja bloqueada, a Phe e seus metabólitos tóxicos, ácido fenilacético (PAA), ácido fenilático (PLA) e ácido fenilpirúvico (PPA) também se acumulam no sangue, fluidos e tecidos corporais e posteriormente são excretados em níveis elevados na urina dos pacientes fenilcetonúricos (Figura 2) (SCRIVER e KAUFMAN, 2001). Além disso, ocorre a diminuição da concentração do produto Tyr, precursor de diversos neurotransmissores, como dopamina e norepinefrina (LEHNINGER, 2008; TAM e ROTH, 1997). Qualquer bloqueio na rota da Phe, seja por deficiência na atividade da PAH, da DHPR ou na síntese de BH<sub>4</sub>, gera uma condição de HPA com aumento plasmático de Phe. A principal causa de HPA é a deficiência severa na atividade da PAH conhecida como PKU (SCRIVER e KAUFMAN, 2001).

Já são mais de 500 mutações descritas no gene que codifica a atividade da enzima PAH, localizado no cromossomo 12, na região 12q22-24.1 (DILELLA *et al.*, 1986; WOO *et al.*, 1983).



**Figura 2.** Rotas alternativas para o catabolismo da fenilalanina na fenilcetonúria. Adaptado de Lehninger, 2008.

### 2.1.2 Classificação

As hiperfenilalaninemias apresentam diferentes fenótipos e são classificadas com base nos níveis séricos de Phe e no percentual de atividade enzimática apresentada pelos pacientes.

A PKU Clássica, considerada a forma grave da doença, é caracterizada por concentrações plasmáticas de Phe superiores a 20 mg/dL. Sua atividade residual é praticamente indetectável, podendo ser inferior a 1%.

A PKU Leve apresenta concentrações plasmáticas de Phe entre 10 mg/dL e 20 mg/dL e atividade enzimática residual entre 1 e 3% e também requer tratamento. A HPA Transitória ou Permanente, considerada a forma benigna da doença, apresenta concentrações plasmáticas de Phe entre 4 mg/dL e 10 mg/dL, tem uma atividade enzimática acima de 3%, não causa sintomatologia clínica e não requer tratamento (MARTINS *et al.*, 2009).

Existe ainda a síndrome conhecida como Fenilcetonúria materna, que ocorre quando mães fenilcetonúricas apresentam níveis plasmáticos elevados de Phe



durante a gravidez. A Phe possui efeitos teratogênicos, podendo levar a criança a retardo mental, dismorfias e microcefalia (LYON *et al.*, 1996).

Dentre os erros congênitos do metabolismo de aminoácidos, a PKU clássica é a doença clinicamente mais encontrada (DE MIRA e MARQUEZ, 2000). A PKU apresenta herança autossômica recessiva, com uma incidência que varia entre as diferentes nações e os diferentes grupos étnicos do mundo (HOFMAN *et al.*, 1991), com prevalência global média estimada de 1:10.000 nascimentos (ALBRECHT *et al.*, 2009). Sua prevalência varia desde 1:4.200 na Turquia (OZALP *et al.*, 2001) e 1:4.500 na Irlanda (ZSCHOCKE *et al.*, 1997) até 1: 80.500 no Japão (KIMURA *et al.*, 2001) e 1:100.000 na Finlândia (GULDBERG *et al.*, 1995). No Brasil, a incidência é de aproximadamente 1:24.780 nascimentos (CARVALHO, 2003).

### 2.1.3 Diagnóstico

No Brasil, a PKU está entre as doenças incluídas no Programa Nacional de Triagem Neonatal e foi o primeiro EIM incluído em programas de triagem neonatal no mundo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). O diagnóstico precoce já nos primeiros dias de vida, a fim de permitir a intervenção dietética, é muito importante para que se evite o dano neurológico irreversível que acomete os pacientes não tratados (BLAU *et al.*, 2010; KOHLI *et al.*, 2005; SCRIVER e KAUFMAN, 2001).

O diagnóstico ocorre pela detecção de níveis elevados de Phe no sangue, geralmente através de sangue em papel filtro, bem como por concentrações elevadas de Phe e seus metabólitos (PPA, PAA e PLA) na urina dos pacientes. Os procedimentos para detecção podem ser feito através do método de Guthrie, métodos cromatográficos, fluorimétricos, espectrofotométricos (CLAGUE e THOMAS, 2002) ou através de espectrometria de massas em tandem (POLLITT, 2006). Esta última é a metodologia utilizada em diversos países para a triagem neonatal na PKU.

Para a realização do teste do pezinho é recomendada que a coleta seja feita após 48 horas do nascimento da criança, entre o terceiro e o quinto dia de vida, para que o aumento da Phe possa ser detectado, pois a mesma precisa ter realizado ingestão protéica. Mesmo que ainda não tenha ocorrido contato do bebê com leite materno, o sangue pode ser coletado, desde que ele esteja sob dieta parenteral (LEVY *et al.*, 1999, SCRIVER *et al.*, 1998).

É possível realizar a dosagem do cofator BH4 em soro e urina de pacientes, podendo determinar se a HPA é decorrente de sua deficiência, sendo importante para o correto tratamento, que normalmente inclui a reposição oral da coenzima. A confirmação do defeito da atividade enzimática da PAH só pode ser realizado através de biópsia hepática (CAMPISTOL *et al.*, 2006).

Também é possível realizar o diagnóstico molecular para a identificação da mutação causadora do defeito genético, permitindo diagnóstico pré-natal para famílias que possuem casos de afetados, além da identificação dos portadores (heterozigotos) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

A quantificação dos níveis de Phe no sangue é importante não somente para diagnosticar, mas também para monitorar o tratamento dos pacientes fenilcetonúricos.

#### **2.1.4 Tratamento**

Os pacientes fenilcetonúricos são normais ao nascimento, mas se não tratados, podem apresentar danos neurológicos irreversíveis já no primeiro ano de vida (COOPER, 2000). O tratamento da PKU perdura por toda a vida, e o prognóstico para aqueles que seguem a dieta é muito melhor.

O tratamento preconizado para a PKU é baseado numa dieta restrita, com baixo teor de Phe, a fim de reduzir ou normalizar os níveis deste aminoácido, já que o grau de retardo mental está diretamente relacionado com os níveis elevados no plasma e tecidos dos pacientes afetados (SCRIVER e KAUFMAN, 2001). Essa alimentação é geralmente combinada com a administração de uma fórmula especial, livre de Phe, que contém os demais aminoácidos, enriquecida com micronutrientes essenciais como vitaminas e minerais (PRZYREMBEL e BREMER, 2000; BURGARD *et al.*, 1999; WAPPNER *et al.*, 1999).

Para os fenilcetonúricos, alimentos proteicos como carne, ovos, leite, queijos e pães são proibidos (WILLIAMS *et al.*, 2008). A dieta deve ser individualizada para cada paciente, pois a tolerância à Phe varia de acordo com a idade, com o peso e também com o grau de deficiência enzimática, geralmente contendo entre 250 mg e 500 mg de Phe/dia, quando o normal de ingestão diária para um indivíduo não fenilcetonúrico é de 2.500 mg de Phe/dia (LEVY, 1999).

Estudos demonstraram que o uso do cofator BH4 foi eficiente na redução dos níveis plasmáticos da Phe em alguns casos (SANTOS *et al.*, 2006; TREFZ *et al.*, 2005).

Novas estratégias terapêuticas vêm sendo estudadas, como a utilização via oral da enzima fenilalanina amônia-liase, que evita a absorção da Phe, ao degradá-la no trato digestivo (SARKISSIAN e GÁMEZ, 2005). Outra estratégia estudada é a suplementação com aminoácidos neutros, como a metionina, tirosina e triptofano, que acredita-se que promovam a diminuição dos níveis de Phe no cérebro por competir por um transportador situado na barreira hematoencefálica (BHE) (SARKISSIAN *et al.*, 2009; MATALON *et al.*, 2006).

No Brasil, o dicloridrato de sapropterina (nome comercial Kuvan<sup>®</sup>), forma sintética do cofator BH4, foi proposto para uso de forma complementar à dieta alimentícia por mulheres fenilcetonúricas que estejam no período pré-concepcional ou em período gestacional, desde que responsivas ao medicamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Um estudo de Weglage e colaboradores (2013) mostrou que o desempenho cognitivo em pacientes PKU adultos tratados precocemente não sofreu deterioração observável em um intervalo de cinco anos. A avaliação neuropsicológica revelou comprometimento neurocognitivo, particularmente em pacientes idosos, parecendo referir-se a um relaxamento precoce da dieta recomendada quando estes pacientes eram adolescentes, mostrando a importância do controle dietético na PKU também durante a adolescência.

### **2.1.5 Manifestações clínicas**

Os pacientes fenilcetonúricos parecem saudáveis ao nascer, mas passado alguns meses onde não haja o tratamento apropriado, podem apresentar retardo mental grave, microcefalia, epilepsia e hiperatividade (SCRIVER e KAUFMAN, 2001).

Pacientes com PKU clássica ainda podem apresentar deficiência na pigmentação da pele, cabelos e olhos, atitudes autistas, transtornos de conduta, falhas no andar ou falar, tremores, falhas no crescimento (SCRIVER, 2001; GREVE *et al.*, 1994), peso cerebral abaixo do normal, menor expectativa de vida (BERG *et al.*, 2004) e necessidade de maior tempo para processar informações (MOYLE *et al.*,

2007). Imagens obtidas através de ressonância magnética nuclear (RMN) mostraram desmielinização (POSER e VAN BOGAERT, 1959) e áreas de vacuolização da substância branca (SHAH, WEINBERGER e MARAVILLA, 1990). Odor de mofo também é uma manifestação clínica relacionada a esta doença, devido à presença do PAA na urina (CENTERWALL e CENTERWALL, 2000).

### 2.1.6 Fisiopatologia

Aparentemente, já se conhece todas as manifestações clínicas da PKU, mas ainda não entendemos por completo o (s) mecanismo (s) de sua principal manifestação - o retardo mental (SCRIVER, 2001).

Embora muitos estudos venham sendo realizados e hipóteses sugeridas, as causas bioquímicas das complicações neurológicas permanecem pouco conhecidas (SCRIVER e KAUFMAN, 2001). Sabe-se que a disfunção cognitiva apresentada por pacientes fenilcetonúricos, pode estar relacionada à elevada concentração sanguínea de Phe (KAUFMAN, 1989). Cabe salientar que a concentração cerebral dos metabólitos (PAA, PPA e PLA) acumulados na PKU está correlacionada positivamente aos níveis plasmáticos de Phe (SARKISSIAN, SCRIVER e MAMER, 2000).

Os pacientes fenilcetonúricos que apresentam deficiência intelectual possuem níveis elevados de Phe no cérebro (SCRIVER *et al.*, 2008). Estudos realizados em camundongos recém-nascidos mostraram que o fenilpiruvato, um dos metabólitos acumulados na PKU, é capaz de produzir necrose cerebral acompanhada de disfunção neurocomportamental (GRAZIT *et al.*, 2003). A Phe em cultura de neurônios corticais cerebrais ocasionou morte celular por apoptose (ZHANG *et al.*, 2007).

Outra hipótese de mecanismo está relacionada ao transporte de aminoácidos. O acúmulo de Phe, no caso da PKU, pode dificultar a passagem de outros aminoácidos neutros de cadeia longa (LNAA) pela BHE, visto que utilizam o mesmo tipo de transportador, resultando em menor concentração destes outros aminoácidos no cérebro e, conseqüentemente, diminuição de síntese proteica e de neurotransmissores (DE GROOT *et al.*, 2010; HOEKSMAN *et al.*, 2009; SCRIVER e KAUFMAN, 2001). Essa redução na síntese de neurotransmissores (dopamina, norepinefrina e serotonina), está relacionada com a deficiência dos aminoácidos

neutros Tyr e triptofano (TAM e ROTH, 1997). A Tyr acaba se tornando um aminoácido essencial para os pacientes fenilcetonúricos, uma vez que sua rota de síntese está bloqueada na doença (VAN SPRONSEN *et al.*, 1996). Importante lembrar que a suplementação apenas com Tyr não impede o retardo mental grave na PKU (VAN SPRONSEN *et al.*, 2001).

Outros estudos indicam envolvimento de enzimas que podem estar relacionadas ao dano neurológico encontrado nos pacientes fenilcetonúricos, como a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, que está reduzida na membrana sináptica em um modelo animal quimicamente induzido de PKU (WYSE *et al.*, 1995).

Além disso, mostrou-se que o metabolismo energético em cérebro de ratos está prejudicado na presença de altas concentrações de Phe, uma vez que a Phe induz a redução na atividade da succinato desidrogenase e dos complexos I-III da cadeia respiratória em concentrações de Phe semelhantes à concentração plasmática encontrada em pacientes (RECH *et al.*, 2002), bem como induz a inibição das enzimas creatina quinase e piruvato quinase em córtex de ratos (COSTABEBER *et al.*, 2003; FEKSA *et al.*, 2002).

Nos últimos anos tem sido sugerido o envolvimento do estresse oxidativo (EO) na fisiopatologia de vários EIM, entre eles a PKU, devido ao acúmulo de metabólitos tóxicos que podem levar à produção de radicais livres (RL) e/ou à diminuição das defesas antioxidantes (GUERREIRO *et al.*, 2018; DONIDA *et al.*, 2017; MESCKA *et al.*, 2016; MARCHETTI *et al.* 2015; WAJNER *et al.*, 2004). Diversos estudos mostram o aumento dos marcadores de EO tanto em pacientes com PKU (DEON *et al.*, 2015b; VARGAS *et al.*, 2011; RIBAS *et al.*, 2011; SITTA *et al.* 2009a,b; Sitta *et al.*, 2006; SIRTORI *et al.*, 2005; Sierra *et al.*, 1998) como em modelos animais (MORAES *et al.*, 2013; FERNANDES *et al.*, 2010; KIENZLE HAGEN *et al.*, 2002). Além disso, a terapia de dieta restritiva também pode alterar o status antioxidante dos pacientes contribuindo para a indução de EO, que pode ser atenuado pelo uso de antioxidantes (DEON *et al.*, 2015a; RIBAS *et al.*, 2014; SITTA *et al.*, 2011; SITTA *et al.*, 2009c).

## 2.2 Radicais Livres

Radical livre é um estrutura química com um ou mais elétrons não pareados ocupando um orbital molecular ou atômico sozinho, o que confere uma alta

reatividade e instabilidade energética à molécula. Estes radicais podem ser formados endogenamente por diferentes mecanismos, como por fagocitose e pela cadeia de transporte de elétrons, bem como por fatores exógenos, tais como cigarro, poluentes do ar, radiação e agentes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Esses RL cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN).

Existem muitos tipos de RL que são produzidos naturalmente nos sistemas biológicos. De fato, a molécula de oxigênio é um radical. No metabolismo celular aeróbico, em condições fisiológicas, em média 95% do oxigênio molecular ( $O_2$ ) sofre redução tetravalente, resultando na formação de água ( $H_2O$ ). Porém, durante esse processo, parte do oxigênio utilizado na respiração mitocondrial não é completamente convertido a  $H_2O$ , podendo formar intermediários reativos, como o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e também a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Assim, o termo ERO incluem não somente os RL, mas também alguns derivados não-radicalares do oxigênio, como o  $H_2O_2$  e o oxigênio *singlet* ( $^1O_2$ ) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

As ERO e ERN ocorrem tanto em condições fisiológicas normais como em processos patológicos do organismo. Caso ocorra um desequilíbrio entre os sistemas de produção e os de remoção dessas espécies reativas (ER), pode resultar em consequências patológicas, como a oxidação de moléculas biológicas, incluindo proteínas, lipídeos e DNA (MAXWELL, 1995). É importante ressaltar que em processos patológicos a formação dessas ER pode ser exacerbada (ZABLOCKA e JANUSZ, 2008). Evidências de danos por RL foram descritas em centenas de estados patológicos, em especial doenças neurodegenerativas. Em alguns destes casos o dano por RL é considerado causa primária, em outros, ele aumenta as complicações da doença (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

### **2.3 Defesas Antioxidantes**

De uma forma geral, para se proteger do dano causado pelos RL, os sistemas biológicos desenvolveram mecanismos de defesa antioxidante, bem como sistemas de reparo, capazes de converter estas ER em derivados inativos (HALLIWELL, 1994). A definição clássica para o termo antioxidante é a de qualquer substância

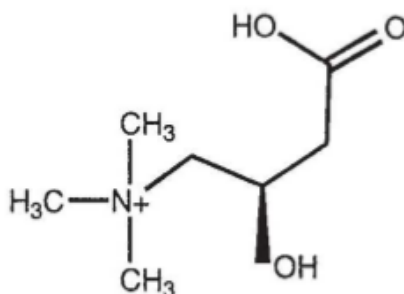
que, quando presente em baixas concentrações em relação a um substrato oxidável, significativamente diminui ou previne a oxidação desse substrato. As defesas antioxidantes que atuam em sistemas biológicos são compostas por antioxidantes enzimáticos e antioxidantes não enzimáticos. Essas defesas agem diminuindo a formação de ER ou removendo-as (ação de sequestro, conhecida como *scavenger*) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Fazem parte das defesas antioxidantes enzimáticas a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) (MATÉS *et al.*, 1999). A CAT é uma hemoproteína presente em todas as células de mamíferos e está localizada, principalmente, nos peroxissomos. Catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio, prevenindo a formação de OH<sup>•</sup>. A SOD é uma metaloenzima presente em todos os organismos aeróbios, que catalisa a dismutação de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> reduzindo-o a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o qual é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a CAT ou GPx. A GPx é uma seleno-enzima, encontrada em todos os tecidos animais, e representa a principal defesa mitocondrial contra o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, já que essas organelas, em geral, não possuem CAT. A ação da GPx consiste na oxidação da glutathione (GSH) a glutathione oxidada (GSSG), reduzindo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). A GSSG consiste de duas GSH ligadas por ponte dissulfeto que pode ser convertida novamente a GSH pela enzima glutathione redutase (GR) com a utilização de NADPH como coenzima (HALLIWELL, 2006). A GPx é considerada um dos principais sistemas de defesa antioxidante do organismo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; MATÉS *et al.*, 1999).

Os antioxidantes não enzimáticos, que apresentam direta ou indiretamente, capacidade de defesa antioxidante, podem ser representados por moléculas sintetizadas no próprio organismo, como a bilirrubina, ácido úrico, melatonina e glutathione, ou por compostos obtidos a partir da dieta, como as vitaminas A, C e E, flavonóides, carotenóides, polifenóis, selênio e L-carnitina (LC) (SALVADOR e HENRIQUES, 2004). O mecanismo de atuação desses antioxidantes é bastante diverso, podendo envolver a remoção do oxigênio presente no meio, o sequestro de ERO ou de seus precursores, inibição da formação de ER, entre outros (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

### 2.3.1 L-Carnitina

A LC é uma amina quaternária de baixo peso molecular, altamente polar (Figura 3). Em humanos, a LC pode ser sintetizada no organismo, embora em menor quantidade, a partir dos aminoácidos essenciais lisina e metionina, síntese esta que ocorre no fígado, cérebro e rins (BREMER, 1983). Ela desempenha um importante papel no metabolismo energético, transportando ácidos graxos de cadeia longa presentes no citosol para a matriz mitocondrial para a síntese de ATP através da  $\beta$ -oxidação (AGARWAL e SAID, 2004).



**Figura 3.** Estrutura química da L-carnitina.

Aproximadamente, 75% da LC presente no nosso organismo é obtida através de fontes dietéticas, oriunda principalmente de alimentos de origem animal, como carnes, ovos, peixes e leite. Uma vez que a principal fonte dietética de LC são carne vermelha e laticínios, a deficiência de LC tem sido descrita em pacientes fenilcetonúricos, que são submetidos a uma dieta restrita em proteínas (SITTA *et al.*, 2009a; SCHULPIS *et al.*, 1990). Nos últimos anos, fórmulas sintéticas utilizadas no tratamento dos pacientes com PKU têm incluído em sua composição a LC.

Estudos têm demonstrado que a LC desempenha outras funções importantes no organismo, como ação antioxidante e antiperoxidativa. A LC tem sido descrita como “*scavenger*” de algumas ERO, como o radical superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio, protegendo as células do dano oxidativo (GÜLÇİN, 2006, RESNICK *et al.*, 1993) além da capacidade de quelar íons  $\text{Fe}^{+2}$  (RESNICK *et al.*, 1993), que participam na formação do radical hidroxila.

Nos últimos anos estudos demonstraram que a suplementação com LC e selênio em pacientes fenilcetonúricos foi capaz de reverter no plasma a peroxidação lipídica e o dano oxidativo protéico, reforçando a importância dos compostos antioxidantes na



doença (SITTA *et al.*, 2011). Da mesma forma, Ribas *et al.* (2010a, b) verificaram efeitos benéficos do tratamento com LC sobre o dano a lipídeos, proteínas e DNA em pacientes com desordens do metabolismo do propionato. Outros estudos demonstraram que pacientes MSUD (do inglês *Maple Syrup Urine Disease* - Doença da urina do xarope do bordo) possuem deficiência de LC e que após dois meses de suplementação houve o restabelecimento desses níveis a valores normais, assim como uma diminuição dos valores de lipoperoxidação no plasma dos pacientes suplementados com este composto e um aumento da capacidade antioxidante urinária (MESCKA *et al.*, 2013, 2015).

Além disso, também tem sido atribuído à LC papel na melhoria das funções imunológicas e ela tem sido sugerida como um agente terapêutico para diversas desordens neurodegenerativas (SOLARSKA *et al.*, 2010). A LC protegeu os astrócitos humanos dos efeitos citotóxicos agudos induzidos pela amônia e os níveis intracelulares aumentados de glutamina e aminoácidos de cadeia ramificada (TING *et al.*, 2018). Além disso, foi verificado *in vitro* em leucócitos humanos, através da técnica de ensaio cometa que a LC em diferentes concentrações foi capaz de diminuir as lesões causadas ao DNA pelo aminoácido Leucina e seu  $\alpha$ -cetoácido correspondente, o ácido  $\alpha$ -cetoisocapróico (MESCKA *et al.*, 2014).

## 2.4 Estresse Oxidativo

O EO vem sendo observado na fisiopatologia de alguns EIM, como aminoacidopatias, acidemias orgânicas e doenças peroxissomais (SITTA *et al.*, 2009a; BARSCHAK *et al.*, 2006; VARGAS *et al.*, 2004) e desempenha um papel importante em doenças neurodegenerativas, uma vez que o cérebro é um órgão extremamente suscetível à ação dos RL, devido ao seu baixo conteúdo de defesas antioxidantes, a alta concentração de neurotransmissores auto-oxidáveis, ao alto conteúdo de lipídeos poliinsaturados, ao alto consumo de oxigênio e ao alto conteúdo de ferro em algumas áreas particulares (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

O EO ocorre quando há um desequilíbrio entre a capacidade antioxidante e as espécies reativas formadas, em favor destas últimas. Ocorrendo o EO o organismo pode reagir de duas maneiras: adaptando-se ou sofrendo dano celular. Em caso de EO brando, o organismo pode reagir através do aumento da produção

de defesas antioxidantes, tentando com isto restabelecer o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante. Mas caso o EO seja severo, pode levar a danos irreversíveis, como a morte celular. Este desequilíbrio pró-oxidante/antioxidante pode causar danos em diversas biomoléculas, podendo resultar na lipoperoxidação das membranas celulares, oxidação de proteínas e lesão ao DNA/RNA celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

#### **2.4.1 Dano ao ácido desoxirribonucléico (DNA)**

As ERO e ERN são capazes de induzir danos diretos na molécula de DNA. O ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, podem provocar dano ao DNA pela interação com metais de transição, como cobre e ferro, através da reação de Haber-Weiss. Adicionalmente, o radical hidroxila, considerado o mais danoso dos RL e conhecido por reagir com todos os componentes da molécula de DNA, pode produzir diferentes produtos quando ataca as bases (purínicas ou pirimidínicas) do DNA. O DNA é particularmente suscetível à oxidação, podendo causar quebras em sua estrutura (simples e duplas), danos alcali-lábeis, *crosslinks* e quebras resultantes de reparo por excisão (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; COLLINS, 2014).

Assim como as defesas antioxidantes protegem as biomoléculas do dano causado por ER, os sistemas biológicos possuem mecanismos de reparo para proteger o DNA e garantir a integridade do genoma (JACKSON e BARTEK, 2009). Entretanto, se esses mecanismos de reparo falharem, este dano pode gerar mutações, deleções, perda de heterozigosidade, aberrações cromossômicas, citotoxicidade e neoplasias (COOKE *et al.*, 2003).

Singh e colaboradores (1988) descreveram a técnica conhecida como ensaio cometa alcalino, que mede o dano ao DNA resultante de sua fragmentação. Os fragmentos de DNA migram para fora do núcleo, formando uma espécie de cauda de cometa, a qual é proporcional ao dano sofrido. Células que não sofrem lesões no DNA, permanecem com o núcleo intacto. O ensaio cometa é extremamente sensível para detectar baixos níveis de dano no DNA, tendo também um baixo custo (LIAO *et al.*, 2009). Diversos estudos em diferentes patologias já relataram dano ao DNA, incluindo na PKU (SITTA *et al.*, 2009b; DEON *et al.*, 2015a).

## 2.5 Estresse Oxidativo na Fenilcetonúria

Embora a causa do EO nos EIM não seja completamente compreendida, acredita-se que possa ser devido ao acúmulo dos metabólitos tóxicos, levando ao acúmulo de RL e/ou alteração do *status* antioxidante levando a um desequilíbrio redox (ARTUCH *et al.*, 2004; WAJNER *et al.*, 2004) e provavelmente contribuindo para o desenvolvimento dos sintomas, principalmente os neurológicos.

O EO vem sendo, há anos, estudado em pacientes e em modelos animais, onde demonstrou sua participação na fisiopatologia da PKU (DEON *et al.*, 2015b; FERNANDES *et al.*, 2010; SITTA *et al.*, 2006; SIRTORI *et al.*, 2005; KIENZLE HAGEN *et al.*, 2002). Estudos em pacientes fenilcetonúricos demonstram que os mesmos apresentam índices elevados de peroxidação lipídica, dano oxidativo a proteínas (pelo aumento do conteúdo de carbonilas e diminuição de grupos sulfidríla), diminuição da reatividade antioxidante total e redução da atividade da enzima GPx. Estudos demonstraram que pacientes PKU com diagnóstico tardio apresentaram os níveis mais elevados desses biomarcadores, sugerindo que a Phe e/ou seus metabólitos provavelmente induzem dano a proteínas e lipídeos (SITTA *et al.*, 2009b; SITTA *et al.*, 2006; SIRTORI *et al.*, 2005).

Pacientes fenilcetonúricos submetidos a dietas restritivas acabam por apresentar baixos níveis de sanguíneos de defesas antioxidantes, entre elas o selênio (GASSIÓ *et al.*, 2008; ARTUCH *et al.*, 2004; COLOME *et al.*, 2003; VAN BAKEL *et al.*, 2000; SIERRA *et al.*, 1998; WILKE *et al.*, 1992). Além disso, é possível verificar nesses pacientes a diminuição da atividade de enzimas antioxidantes, entre elas a GPx, dependente de selênio (SIERRA *et al.*, 1998; WILKE *et al.*, 1992). Outro estudo demonstrou que pacientes com PKU que suplementaram a dieta por um longo período com uma mistura contendo selênio e LC, esta suplementação foi capaz de corrigir o dano oxidativo lipídico e protéico e restaurar a atividade da GPx. Por essa razão, os autores sugeriram que a suplementação de selênio e LC deve ser utilizada como terapia adjuvante para os pacientes com PKU que fazem uso de dietas artificiais (SITTA *et al.*, 2011).

Através do ensaio cometa alcalino, foi verificado que a Phe induz dano ao DNA *in vivo* e *in vitro* de maneira dose-dependente em leucócitos de pacientes PKU (SITTA *et al.*, 2009c), e que a co-incubação da Phe com LC reduziu significativamente o índice de dano ao DNA quando comparada ao grupo controle,

indicando que o dano ao DNA na PKU parece estar fortemente correlacionado com as concentrações de Phe no sangue e podendo hipotetizar que a LC proteja contra danos ao DNA nestes pacientes (DEON *et al.*, 2015a). Outro estudo verificou aumento nos níveis de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), um produto do dano oxidativo ao DNA, no soro de pacientes PKU mal controlados (com altos níveis de Phe), que foram positivamente correlacionados com os níveis de Phe no plasma (SCHULPIS *et al.*, 2005).

Foi verificada peroxidação lipídica, além de dano oxidativo a proteínas, diminuição da capacidade antioxidante urinária em pacientes fenilcetonúricos tratados com dieta de restrição protéica. Foi demonstrado também neste estudo que as citocinas inflamatórias IL-6 e IL-1 $\beta$  estavam significativamente aumentadas, fornecendo evidências de que ocorre o estado pró-inflamatório nesses pacientes. Além disso, IL-1 $\beta$  foi correlacionado positivamente com os níveis de isoprostanos, um marcador de dano lipídico. A di-tirosina foi positivamente correlacionada com Phe, o que indica o dano oxidativo às proteínas, bem como com o PAA. Essas descobertas podem sugerir que o dano protéico pode ser induzido por Phe e seu metabólito PAA na PKU. Os resultados deste estudo indicam que ocorrem estados pró-oxidantes e pró-inflamatórios na PKU que estão, em parte, correlacionados e que a oxidação protéica parece ser induzida pela Phe e pelo PAA em pacientes com PKU (DEON *et al.* 2015b).

Em modelos animais, demonstrou-se que a Phe *in vitro* diminuiu significativamente as defesas antioxidantes e estimulou a peroxidação lipídica no cérebro de ratos com 6 dias de vida (KIENZLE HAGEN *et al.*, 2002). Ainda, foi verificado num estudo *in vitro* que a Phe induziu dano oxidativo a lipídeos e proteínas e diminuiu a concentração de glutathiona reduzida no hipocampo e no córtex cerebral de ratos PKU em desenvolvimento. Os autores também relataram que os principais metabólitos do catabolismo da Phe, o fenilpiruvato, fenilactato e fenilacetato também aumentaram a peroxidação lipídica no córtex cerebral e que o dano oxidativo lipídico induzido pelo Phe foi totalmente evitado pelo sequestro dos RL pelo  $\alpha$ -tocoferol e melatonina, implicando uma produção de radicais peroxil e hidroxil induzida por Phe (FERNANDES *et al.*, 2010).

O antioxidante ácido lipóico reverteu a atividade reduzida das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx, bem como aumentou os níveis de defesas antioxidantes provocadas *in vitro* e *in vivo* por um modelo quimicamente induzido de

hiperfenilalaninemia no cérebro de ratos (MORAES *et al.*, 2010). Além disso, também foi demonstrado que as atividades da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e da CAT foram significativamente aumentadas nos eritrócitos de animais PKU, indicando uma ruptura do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante em animais PKU desenvolvidos geneticamente (ERCAL *et al.*, 2002).

Simon e colaboradores (2013) verificaram dano ao DNA no cérebro e no sangue de ratos submetidos à HPA, sugerindo que o dano ao DNA decorrente das altas concentrações de Phe no cérebro poderia ser, pelo menos em parte, responsável pela disfunção neurológica observada em pacientes PKU.



### **3. OBJETIVOS**

---





## **Objetivo Geral**

O objetivo geral deste trabalho foi investigar o efeito *in vitro* da LC sobre o estresse oxidativo na PKU em células gliais C6 e leucócitos humanos enriquecidos com fenilalanina e seus metabólitos, ácido fenilacético, ácido fenilalânico e ácido fenilpirúvico, a fim de avaliar se a administração da LC é capaz de proteger dos efeitos deletérios dos metabólitos acumulados na doença.

## **Objetivos específicos**

a) Avaliar o efeito *in vitro* da Phe e dos metabólitos acumulados na PKU (PAA, PLA e PPA) sobre o dano ao DNA através do ensaio cometa em cultura de células gliais e em leucócitos humanos obtidos de sangue total;

b) Avaliar o efeito *in vitro* da LC sobre o dano ao DNA em cultura de células gliais e leucócitos periféricos humanos enriquecidos com fenilalanina e seus metabólitos, através do ensaio cometa;

c) Verificar o conteúdo de espécies reativas de oxigênio *in vitro* em cultura de células gliais enriquecidas com Phe, PAA, PLA e PPA, avaliando o possível papel antioxidante da LC.



## **4. RESULTADOS**

---



Os resultados dessa dissertação serão apresentados na forma de capítulo/artigo científico.

#### **4.1 CAPÍTULO I - Prevention of DNA damage by L-carnitine induced by phenylalanine and its metabolites in Phenylketonuria using C6 glial cells and human peripheral leukocytes**

Jéssica Lamberty Faverzani, Aline Steinmetz, Marion Deon, Desirée Padilha Marchetti, Gilian Guerreiro, Angela Sitta, Daniella de Moura Coelho, Leopoldo Vinicius Martins Nascimento, Verônica Bidinotto Brito, Vanusa Manfredini, Dinara Jaqueline Moura, Carmen Regla Vargas.

Artigo científico submetido ao periódico *JCB* – Journal of Cellular Biochemistry.



**Title:** Prevention of DNA damage by L-carnitine induced by phenylalanine and its metabolites in Phenylketonuria using C6 glial cells and human peripheral leukocytes

**Short title:** Prevention of DNA damage by L-carnitine

Jéssica Lamberty Faverzani<sup>a,d\*</sup>, Aline Steinmetz<sup>b</sup>, Marion Deon<sup>d</sup>,  
Desirée Padilha Marchetti<sup>c</sup>, Gilian Guerreiro<sup>a</sup>, Angela Sitta<sup>d</sup>, Daniella  
de Moura Coelho<sup>d</sup>, Leopoldo Vinicius Martins Nascimento<sup>b</sup>, Verônica Bidinotto  
Brito<sup>b,e</sup>, Vanusa Manfredini<sup>f</sup>, Dinara Jaqueline Moura<sup>b</sup>, Carmen Regla Vargas<sup>a,b,d\*</sup>

a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

b Universidade Federal de Ciências de Saúde de Porto Alegre, Rua Sarmiento Leite, 245, CEP 90050170 Porto Alegre, RS, Brazil.

c Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

d Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

e Faculdades Integradas de Taquara, Avenida Oscar Martins Rangel, 4500 (RS 115) –CEP 95600-000 Taquara, RS, Brazil.

f Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, CEP97508-000, Uruguaiana, RS, Brazil.

**Authors e-mails:** jelamberty@hotmail.com; alinestein2009@hotmail.com;  
marion\_deon@yahoo.com.br; desireepmarchetti@gmail.com;  
gilian\_guerreiro@hotmail.com; angelasitta@yahoo.com.br; dcoelho@hcpa.edu.br;  
leopoldomartinsnascimento@gmail.com; veronicabrito@faccat.br;  
vanusa\_manfredini@yahoo.com.br; dinjamoura@gmail.com; crvargas@hcpa.edu.br

**\*Correspondence:**

Corresponding authors: Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350. CEP 90.035003, Porto Alegre, RS, Brasil. Telephone: +55 51 33598011. Telefax: +55 51 33598010.

**E-mail addresses:**

crvargas@hcpa.edu.br (Profa. Dra. Carmen Regla Vargas)  
jelamberty@hotmail.com (Jéssica Lamberty Faverzani)

**Abstract**

In Phenylketonuria (PKU) part of phenylalanine (Phe) is metabolized by alternative pathways producing phenylketones. Considering that pathophysiology of neuronal damage of this disease isn't well characterized yet, we investigated the effects of Phe and its metabolites, phenylacetic (PAA), phenyllactic (PLA), and phenylpyruvic (PPA) acids, as well as the effect of L-carnitine (LC) on C6 glial cells and white blood cells from healthy individuals. A pre-treatment was performed with LC followed by Phe, PAA, PLA or PPA. After treatments the viability (by neutral red assay), DNA damage (by comet assay) and oxidative stress (by DCF oxidation assay) were evaluated. In leukocytes, the co-treatment with Phe, PAA, PLA, PPA and LC was done for further DNA analysis. Glial cells exposed to Phe, PAA, PLA or PPA presented an increase in DNA damage and oxidative stress generation compared to non-treated glial cells. Pre-treatment with LC reduced significantly DNA damage index, however LC didn't reduced reactive species generated by PLA (6  $\mu$ M) or PPA. In leukocytes, Phe, PAA, PLA and PPA induced an increase in DNA damage and co-treatment with LC reduced significantly the DNA damage. The present work yields experimental evidence that DNA damage and reactive oxygen species generation occurs in PKU and may be induced by Phe and its metabolites and that LC protect in peripheral and central level against this damage. This study highlights for the first time in literature the LC role as neuronal antioxidant that may be considered as a suitable adjuvant therapy to avoid neurological damage in PKU.

**Keywords**

Phenylketonuria; L-carnitine; phenylalanine; phenylacetic acid; phenyllactic acid; phenylpyruvic acid.

**Abbreviations**

CNS: central nervous system; DI: damage index; DCF: dichlorofluorescein; G6PD: glucose-6-phosphate dehydrogenase; H<sub>2</sub>DCF-DA: 2',7'- dichlorofluoresceindiacetate; LC: L-carnitine; LNAA: large neutral amino acids; OCTN2: carnitine/organic cation transporter; PAA: phenylacetic acid; Phe: phenylalanine; PKU: Phenylketonuria; PLA: phenyllactic acid; PPA: phenylpyruvic acid; ROS: reactive oxygen species; SEM: Standard error of mean; Tyr: tyrosine.



## Introduction

Phenylketonuria (PKU) is an autosomal recessive disorder caused by deficiency or absence of the liver-specific enzyme phenylalanine hydroxylase (EC 1.14.16.1) activity, that converts phenylalanine (Phe) to tyrosine (Tyr) (Scriver and Kaufman 2001). As result, Phe and its metabolites, phenylacetic (PAA), phenyllactic (PLA), and phenylpyruvic (PPA) acids accumulate in the blood, tissues and other biologic fluids of affected patients (Scriver and Kaufman 2001; Casey 2013). If untreated, phenylketonuric patients present elevated concentrations of Phe and its metabolites interfering with normal development of the central nervous system (CNS), leading to severe mental retardation, the major clinical feature of this disease. Patients can also manifest microcephaly, epilepsy, developmental delay and cerebral white matter abnormalities, besides behavioral or psychiatric alterations (Scriver and Kaufman 2001; Casey 2013; Vockley et al. 2014).

New therapies are being evaluated for phenylketonuric patients, such as administration of tetrahydrobiopterin, large neutral amino acids (LNAA), phenylalanine ammonia lyase, glycomacropeptide and gene therapy (Blau et al. 2010), but the golden standard treatment is based of restriction of Phe intake, through natural protein restricted diet supplemented with Phe-free amino acid mixture enriched with some essential micronutrients (Przyrembel and Bremer 2000; Scriver and Kaufman 2001) that could lead to L-carnitine (LC) deficiency (Sitta et al. 2009a). Although Phe and its metabolites are thought to be neurotoxic in PKU, there is no unanimity about the mechanism responsible for the CNS related problems (Scriver and Kaufman 2001; van Spronsen et al. 2001). Different mechanisms by which Phe can induces its deleterious effects on brain include impairment of LNAA uptake into brain, reduction of the availability for neurotransmitters synthesis, inhibition of key enzymatic activities, reduction of the activity of monoamine oxidase B as modifying gene and alteration on myelin metabolism (Ghozlan et al. 2004; Anderson et al. 2007; Blau et al. 2010; Deon et al. 2015a).

In this context, evidence indicate that oxidative stress, an imbalance between reactive oxygen species (ROS) production and the antioxidant systems, (Halliwell and Gutteridge 2007) is involved in the pathophysiology of PKU possibly contributing to neurological damage (Sitta et al. 2009a, b, 2011; Ribas et al. 2011). This alteration can cause damage in the cellular macromolecules, as DNA, proteins and lipids (Halliwell and Gutteridge 2007).

It has been proposed that Phe metabolites may participate of the mental retardation pathogenesis in PKU, since cytotoxic effects of Phe, PPA and PAA in oligodendrocytes were reported by Kaufman (1989). Phenylpyruvate, phenyllactate and phenylacetate increased lipid peroxidation marker in cerebral cortex, but to a lesser degree than Phe (Fernandes et al. 2010). Likewise, it has been demonstrated that DNA damage in peripheral blood leukocytes was elevated in PKU patients, possibly due to the oxidative damage mediated by high Phe levels (Sitta et al. 2009c) and that LC was able to prevent this damage, hypothesizing that LC protects at peripheral level against DNA damage in PKU patients (Deon et al. 2015a). Fischer et al. (2000) reported that PAA was capable to inhibit the LC biosynthesis in rats.

LC is a small quaternary amine, highly polar, that can be synthesized endogenously (Bremer 1983; Foster 2004) or obtained in bigger amount from dietary source, mainly by red meat and milk, which are restricted foods for PKU patients (Gülçin 2006). It plays an important role in energy metabolism, transporting long-chain fatty acids present in the cytosol across the inner mitochondrial membrane for  $\beta$ -oxidation (Agarwal and Said, 2004; Gulçin 2006). LC deficiency has been described in phenylketonuric patients submitted to protein restricted diet (Schulpis et al. 1990; Sitta et al. 2009a). In the last years, studies have demonstrated that LC has antioxidant properties and may protect cells from toxic ROS in some metabolic disorders (Sitta et al. 2011; Ribas et al. 2014; Guerreiro et al. 2018). In this context, studies have reported that LC may protect cells against oxidative damage in important neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease and some inherited neurometabolic disorders (Abdul and Butterfield 2007; Ribas et al. 2014; Mescka et al. 2016).

The nervous system is constituted from two broad categories of cells, neurons and glial cells. Glial cells provide support and nutrition to neurons and maintain appropriate concentrations of ions and neurotransmitters in the neuronal environment. The main glial cell types are, in the CNS, astrocytes and oligodendrocytes. In this way, and by their ability to remove potentially cytotoxic amino acids, astrocytes are likely to be important regulators of many pathological processes (Jessen 2004). The cells of the adult human brain consume approximately 20% of the oxygen utilized by the body and the ROS are generated at high rates within the brain (Dringen et al. 2000). C6 glial cells are a reliable model widely used in studies of protective mechanisms against neuronal oxidative stress, and have

provided a useful model to study glial cell properties, glial factors, and sensitivity of glial cells to various substances and conditions (Mangoura et al. 1989; Dringen et al. 2000; Marchetti et al. 2018).

In this work, in order to investigate the neuropathology involved in phenylketonuria and to test the hypothesis that Phe and its metabolites (PAA, PLA and PPA) induce in vitro DNA damage and oxygen reactive species production we used cultured C6 glial cells and white blood cells from healthy individuals. We also aimed to study the protective effect of LC on C6 glial cells and leukocytes exposed to Phe and its metabolites.

## **Experimental procedures**

### **C6 Glial Cells Culture and L-carnitine Treatment**

C6 rat glial cells line (ATCC ® Number: CCL-107™, Rockville, Maryland, USA), which are already well characterized as the glia model, were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM obtained from Gibco, Grand Island, NY, USA) containing 5% of fetal bovine serum at 37 °C in a humid atmosphere containing CO<sub>2</sub> 5% and harvested by treatment with 0.15% trypsin-0.08% EDTA in PBS. At confluence, Phe (150 and 300µM), PAA (2 and 4µM), PLA (3 and 6µM) and PPA (2 and 4µM) as well as in two concentration ranges ([Phe 150µM + PAA 2µM + PLA 3µM + PPA 2µM]) and ([Phe 300µM + PAA 4µM + PLA 6µM + PPA 4µM]) to mimic what occurs in the disease, were added to the cell culture. After 24 h, the cells were harvested with trypsin and resuspended in a medium at the concentration of 5 × 10<sup>5</sup> cells/mL and 1 mL aliquots were seeded into multiple 24-well plates. A pre-treatment was performed for 2 h at 37 °C with LC (60 µM) antioxidant. Phe, PAA, PLA and PPA concentrations used in this study were based on previous studies obtained by Tuchman and co-workers (1985) and de Groot and co-workers (2015) and the LC concentration was based in studies performed by Mescka and co-workers (2016). Cells and supernatants were harvested for analysis of oxidative stress and DNA damage. The C6 glial cells we used in this study were early passage cells (up to passage 24). Early passage cells have similar characteristics to immature cells, and are related to the expression of astrocytes and oligodendrocytes.

### **C6 Glial Cells Cytotoxicity Assay**

The cytotoxicity was evaluated using neutral red uptake assay, in accordance with protocol previously described (Repetto et al. 2008). This assay is based in the incorporation of neutral red dye into lysosomes of viable cells. Briefly, after treatment cells were washed with PBS and incubated with 250  $\mu$ L of neutral red solution (25  $\mu$ g/mL) at 37 °C for 3 h. After this, cells were washed and incubated for 30 min, protecting from light, with adsorbent solution (mixture of acetic acid, ethanol, and water in ratio of 1:50:49). Absorbance was measured in SpectraMax® M2<sup>e</sup> Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California at 540 nm. The absorbance of untreated cells was set as 100% of viability and the values for treated cells were calculated as a percentage of the control.

### **Blood sample and leukocytes in vitro studies**

Venous blood samples were collected into heparinized vials under sterile conditions from three healthy volunteers and used for the control group (without metabolites), and tested metabolites groups. Leukocytes from each control subject were separately pre-treated with two concentrations of Phe (600 and 1200  $\mu$ M), PAA (5 and 10  $\mu$ M), PLA (10 and 20  $\mu$ M) and PPA (10 and 15  $\mu$ M) and in two concentration ranges ([Phe 600  $\mu$ M + PAA 5  $\mu$ M + PPA 10  $\mu$ M + PLA 10  $\mu$ M]) and ([Phe 1200  $\mu$ M + PAA 10  $\mu$ M + PPA 15  $\mu$ M + PLA 20  $\mu$ M]) for 6 h at 37 °C following comet assay protocol (Tice et al. 2000; Hartmann et al. 2003). These Phe concentrations are similar to those found in blood from PKU patients, which can vary from 100  $\mu$ mol/L, in well-treated patients, to more than 2500  $\mu$ mol/L, at diagnosis (Williams et al. 2008; Trefz et al. 2011). The concentrations of the metabolites were chosen based on the study of Tuchman et al. (1985). All participants or their legal guardians gave informed written consent for the present study, which was approved by the Ethics in Research Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil (projects n.º 2018-0527).

### **In vitro effect of L-carnitine on DNA damage**

Leukocytes from healthy volunteers were incubated without metabolites and LC (control group), and in the presence at two concentration ranges ([Phe 600  $\mu$ M + PAA 5  $\mu$ M + PPA 10  $\mu$ M + PLA 10  $\mu$ M]) and ([Phe 1200  $\mu$ M + PAA 10  $\mu$ M + PPA 15  $\mu$ M + PLA 20  $\mu$ M]) and in a co-treatment with two concentration of LC (30 and 100

μM) for 6 h at 37 °C. The concentrations of LC in the assays were based on previous studies obtained by Deon et al. (2015a).

### **2',7'-dichlorofluorescein Oxidation Assay (DCF)**

ROS production was measured in C6 glial cells following the method of Lebel et al. (1992) using 2',7'- dichlorofluoresceindiacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA), which in the presence of ROS lead the DCF (dichlorofluorescein) production, a fluorescent product that can be quantified by fluorimetry. Fluorescence intensity was read at excitation wavelength=480nm and emission wavelength=535nm. Calibration curve was performed with standard DCF (7 μM) and the results are presented as nanomoles DCF per milligram of protein. Protein concentrations in protein extracts of C6 glial cells culture were determined by the method of Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as standard.

### **Alkaline Comet Assay (single cell gel electrophoresis)**

The alkaline comet assay, that measures single and double DNA strand breaks, was performed following to the method described by Singh et al. (1988) and according to general comet assay guidelines (Tice et al. 2000; Hartmann et al. 2003). Cell culture (10<sup>4</sup> cells/mL) and isolated human leukocytes were suspended with low melting point agarose solution and spread on agarose-precoated microscope slides. For each treatment, three slides were made. Slides were incubated in ice-cold lysis solution (2.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris, 100 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100 and 10% DMSO, pH 10.0) at 4 °C for at 24 h to remove cell membranes, leaving DNA as "nucleoids". Then, slides were placed in a horizontal electrophoresis unit and incubated with fresh alkaline buffer solution (300 mmol/L NaOH, 1 mmol/L EDTA, pH 13.0) at 4 °C for 20 min to allow DNA unwinding and the expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was conducted for 20 min at 25 V (300mA; 0.9V/cm). All these steps were performed under yellow light or in the dark to prevent additional DNA damage. After electrophoresis, the slides were neutralized with 0.4 M Tris (pH 7.5), washed in bi-distilled water, and the DNA fixed and stained using silver nitrate staining protocol (Nadin et al. 2001). After drying at room temperature overnight, gels were analyzed using an optical microscope. One hundred cells from each treatment were selected and analyzed for DNA migration and the average of the three slides from each treatment group was used to determine the damage index (DI). DI is an

arbitrary score calculated for cells in different damage classes, which is scored visually according to the tail length of the “comet” into five classes: class 0, undamaged, without a tail; class 1, with a tail shorter than the diameter of the head nucleus; class 2, with a tail length one to twofold greater than the diameter of the head; class 3, with a tail longer than twofold the diameter of the head; and class 4, comets with no heads. The damage index ranges from 0 (no tail) to 400 (maximum migration). The slides were analyzed under blind conditions at least by two different individuals.

### **Statistical analysis**

The results are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Comparisons between the mean values were made through one-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test. A p value lower than 0.05 was considered significant. The software used for statistical analysis and graphs was GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA-version 5.0).

## **Results**

### **Cell Cytotoxicity Assay**

Figure 1 demonstrates that LC, Phe and its metabolites (PAA, PLA and PPA) do not reduce cell viability. A slight inhibition of viability was observed in the treatment with the highest PLA concentration, however, was not significant [ $F(9,80) = 0.7095$ ,  $p > 0.05$ ]. These results allow us to assert that the Phe and its metabolites and LC did not impair cell growth, making viable our experiments.

### **L-carnitine decreases in vitro the DNA damage induced by Phe and its metabolites in glial cells**

Using comet assay, we evaluated the in vitro effect of LC on DNA damage induced by Phe, PAA, PLA and PPA in C6 glial cells and in white blood cells from healthy individuals. In glial cells, tested Phe concentrations (150 and 300  $\mu\text{M}$ ) induced a significant increase in DNA damage (1498% and 1343%, respectively) compared to non treated cells (Fig. 2a). In addition, it can be seen that LC (60  $\mu\text{M}$ ), when added to the glial cells exposed to Phe, was capable to significantly reduce (87% and 83%, respectively) the DNA damage [ $F(4,12) = 59.49$ ,  $p < 0.0001$ ]. Figure 2b

demonstrates that glial cells exposed to PAA (2 and 4  $\mu\text{M}$ ) showed ten to twelve times more DNA damage index compared to native glial cell (DMEM). In it is possible to observe also that LC (60  $\mu\text{M}$ ) when added to the glial cells exposed to PAA, was capable to reduces significantly 90% the DNA damage in both concentrations tested [F (4,10) = 49.23,  $p < 0.0001$ ]. It can be observed in Figure 2c that, in the presence of PLA (3 and 6  $\mu\text{M}$ ) the glial cells have increased approximately eight and eleven times more DI compared to native glial cells (DMEM), respectively. Moreover, LC (60  $\mu\text{M}$ ) was effective in decreased significantly two and four times more DNA damage, respectively, compared to cells enriched with the PLA [F (4,10) = 41.78,  $p < 0.0001$ ]. Figure 2d demonstrates that glial cells exposed to PPA (2 and 4 $\mu\text{M}$ ) produced an increase (2218% and 1694%, respectively) in DNA damage compared to non treated cells. LC (60  $\mu\text{M}$ ), when added to glial cells exposed to PPA (2 and 4 $\mu\text{M}$ ), was capable to significantly reduce DI in 96% in both concentrations tested [F (4,10) = 41.78,  $p < 0.0001$ ]. Interestingly, PPA caused approximately two times more DNA damage in glial cells when compared the PAA and PLA. Figure 2e demonstrates that glial cells exposed to Phe, PAA, PLA and PPA (two concentration ranges) showed eight and ten times more DNA damage index compared to native glial cell (DMEM), respectively. In addition, it can be seen that LC (60  $\mu\text{M}$ ), when added to the glial cells exposed to two concentration ranges, was capable to reduces, in both, approximately 90% DNA damage, respectively [F (4,10) = 150.4,  $p < 0.0001$ ].

### **Phe and its metabolites induced in vitro DNA damage in leukocytes and L-carnitine has protective action**

Figure 3a illustrates that in leukocytes from whole blood of healthy subjects occur greater DNA migration induced by both Phe concentrations 600 and 1200  $\mu\text{M}$  (450% and 614%, respectively) when compared to control group [F (2,6) = 858.4,  $p < 0.0001$ ]. It can be observed in Figures. 2b, 2c and 2d that all tested concentrations of PAA (5 and 10  $\mu\text{M}$ ), PLA (10 and 20  $\mu\text{M}$ ) and PPA (10 and 15  $\mu\text{M}$ ) resulted in a DI that was significantly higher compared to control group (47.4%, 85.5%, 26.8%, 47.4%, 103.1% and 147.4%, respectively) ([F (2,6) = 94.20,  $p < 0.0001$ ], [F (2,6) = 49.33,  $p < 0.001$ ] and [F (2,6) = 204.5,  $p < 0.001$ ], respectively). It was verified that the highest concentrations of PAA, PLA and PPA increased significantly DNA damage (25%, 16% and 22%, respectively) when compared to tested lower concentrations of these metabolites. Figures 3e and 3f show that the combination of

Phe and its metabolites tested in the two concentration ranges ([Phe 600  $\mu$ M + PAA 5  $\mu$ M + PLA 10  $\mu$ M + PPA 10  $\mu$ M] and [Phe 1200  $\mu$ M + PAA 10  $\mu$ M + PLA 20  $\mu$ M + PPA 15  $\mu$ M]) induced a significant increase in DNA damage (515% and 639%, respectively) when compared to the control group ([F (3,8) = 3223,  $p < 0.0001$ ] and [F (3,8) = 3028,  $p < 0.0001$ ], respectively). It was verified that the co-treatment with LC at the concentrations 30 and 100  $\mu$ M reduced significantly DI (4.5% and 19%, respectively). In the highest tested concentration range, only LC 100  $\mu$ M reduced significantly DNA damage (18%). Furthermore, when comparing the effect of LC concentrations (30 and 100  $\mu$ M) in both concentrations ranges, it was found that LC 100  $\mu$ M concentration significantly decreased around 15% DNA damage compared with LC 30  $\mu$ M.

### **ROS generation is increased by Phe and its metabolites and is decreased by L-carnitine**

Figures 4a and 4b illustrate that compared to control group, the ROS production, evaluated by DCF production, in glial cells was increased by Phe (150 and 300  $\mu$ M) and PAA (2 and 4  $\mu$ M) cellular treatment, with a significant protective effect of LC (60  $\mu$ M) which reduces the ROS produced by Phe and PPA back to the control level [F (4,10) = 66.53,  $p < 0.0001$ ] and [F (4,10) = 150.3,  $p < 0.0001$ ], respectively. Figure 4c demonstrates that glial cells exposed to PLA (3 and 6  $\mu$ M) showed an increase in ROS generation of about 40% in both concentrations compared to untreated glial cells. In addition, when LC (60  $\mu$ M) was added to the glial cells pre-treated with PLA 3  $\mu$ M, this compound reduces ROS generation in approximately 24.5%. However, LC (60  $\mu$ M) did not reduce the increase in ROS formation induced by PLA 6  $\mu$ M [F (4,10) = 9.532,  $p < 0.01$ ]. Figure 4d demonstrates that glial cells exposed to PPA (2 and 4  $\mu$ M) showed an increase in ROS generation 36% in both concentrations compared to untreated cells. In addition, it can be seen that LC (60  $\mu$ M), when added to the glial cells pre-treated with PPA 2  $\mu$ M or 4  $\mu$ M, was not capable to reduce significantly ROS formation metabolite-induced [F (4,10) = 13.36,  $p < 0.001$ ]. Figure 4e shows the combination of pre-treatments with Phe and its metabolites, which are tested in the two concentration ranges (lowest and highest concentrations). This association induced a significant increase in ROS generation (36.7% and 112.9%, respectively) when compared to native glial cells. In addition, it can be seen that the co-treatment with LC (60  $\mu$ M) reduced significantly DCF production (34.7% and



47.2%, respectively for the lowest and highest concentrations) [ $F(4,10) = 60.27, p < 0.0001$ ].

## **Discussion**

Severe mental retardation, which is the hallmark of untreated phenylketonuric patients, can be almost completely prevented when patients adhere to a poor phenylalanine diet (Hendriksz and Walter 2004). Previous studies have shown that PKU patients under restricted diet present low levels of selenium and LC (Schulpis et al. 1990; Wilke et al. 1992; Artuch et al. 1999; Sitta et al. 2009b). Although necessary, this diet of low ingestion of proteins decreases the bioavailability of essential nutrients, including antioxidant compounds (Acosta 1996). Several studies have shown that oxidative stress plays an important role in the pathogenesis and progression of the neurological damage of PKU. These works have reported that oxidative stress may be the result from the accumulation of Phe and/or its metabolites leading to the induction of free radical production or because of reduction of antioxidants or their precursors secondary to restricted diets (Ribas et al. 2011; Rocha and Martins 2012), interfering in the normal development of the CNS and provoking molecular events that are not well characterized yet.

Considering that it is currently unknown how brain cells react to Phe and its metabolites accumulation, we aimed to investigate the neurotoxic effects of Phe, PPA, PLA and PPA in C6 glial cells and the protective role of LC antioxidant compound on the cells exposed to these metabolites. When we observed the cytotoxicity assay by neutral red, it was possible to conclude that Phe, the metabolites and LC did not impair cell growth.

Free radicals and other reactive species are constantly produced in the brain, where antioxidant defenses are modest. However, overproduction of free radicals can cause oxidative damage to biomolecules such as proteins, lipids and DNA, (Halliwell and Gutteridge 2007) leading to cell injury, mutations, deletions, neoplastic growth and even cell death (McCord 2000; Cooke et al. 2003). A variety of lesions in DNA can occur by induction of reactive species including oxidized bases, abasic sites, DNA strand breaks, and cross-links between DNA and proteins (Halliwell and Gutteridge 2007).

In a first moment, the alkaline comet assay, technique that measures DNA strand breaks in single cells (Singh et al. 1988), considered relatively simple, rapid, low-cost,

and sensitive for the analysis of DNA damage in all cell types (Liao et al. 2009), was used in this work to assess the in vitro effects of LC on the DNA damage induced by two different concentrations of Phe, PAA, PLA and PPA, as well as the combined effect of the Phe and its metabolites in glial cells. To our knowledge, the present study is the first report investigating DNA damage in the glial cells induced by Phe and its metabolites. In this method (single-cell gel electrophoresis), increased DNA migration can be associated with incomplete excision repair systems (Tice et al. 2000), which are generated as an intermediate step during the action of different DNA repair systems (Speit and Hartmann 1995). We verified that glial cells exposed to Phe in the two concentrations tested showed an increase in DNA damage index, compared to control cells (native glial cells). Similar results were found to PAA, PLA and PPA in combination with Phe when compared to native glial cells, demonstrating a synergic toxic effect of these compounds. Besides, as shown in Figures 2 (a, b, c and d), we observed that the DNA damage induced by PPA is higher than that damage induced by others metabolites. This difference may have been caused by significant increase of cells with DNA damage class type 2, 3 and some 4, while the others metabolites presented DNA damage class type 1 and 2 (data not shown).

Recent reports showed that Phe induced cell damage in astrocytes cultures from newborn Wistar rats, suggesting that these alterations may contribute to the brain damage found in PKU patients (Preissler et al. 2016). In addition, other studies verified DNA damage in hyperphenylalaninemia, in the brain and blood of rats, also suggesting that high brain Phe concentrations could be responsible by neurological dysfunction (Simon et al. 2013). Phe, PAA and PPA caused toxicity in cerebellum culture of animal models studied (Kaufman 1989) and Phe in culture of cerebral cortical neurons caused cell death by apoptosis (Zhang et al. 2007). Studies in newborn mice have shown that PPA has been able to produce cerebral necrosis accompanied by neurobehavioral dysfunction (Gazit et al. 2003). Oberdoester et al. (2000) suggested that Phe metabolites could have adverse effects in development glial cells, which was observed mainly when a human astrocyte cells culture was exposed to PAA, presenting reduction in cell proliferation. However, Schoemans and co-workers (2010) did not detect direct cytotoxicity in primary oligodendrocytes cultured in the presence of high concentrations of Phe, PAA and PPA, suggesting that alternative mechanisms may be involved. It was observed that PPA significantly reduced glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity of rat brain

homogenates. This inhibition caused by PPA could elicit an impairment of NADPH production and might eventually alter the cellular redox status (Rosa et al. 2012).

In the next step, we tested the *in vitro* effect of LC on the DNA damage caused by same metabolites (Phe, PAA, PLA and PPA) and previous concentrations tested. Pre-treatment with LC 60  $\mu\text{M}$  added to glial cells, was capable to reduce DNA damage (87% and 83%) induced by Phe (150 and 300  $\mu\text{M}$ , respectively). The same occurred when we evaluated the effect of LC in the DNA damage caused by Phe metabolites. LC was capable to reduce DNA damage induced by PAA 2 and 4  $\mu\text{M}$  (89% respectively in both concentrations), PLA 3 and 6  $\mu\text{M}$  (52% and 77%, respectively) and PPA 2 and 4  $\mu\text{M}$  (96% respectively in both concentrations). The pre-treatment with LC (60  $\mu\text{M}$ ) reduced significantly DNA damage (90%, approximately) when compared to the effect of Phe and its metabolites together in the two concentration ranges tested. Brain carnitines can function in the synthesis of lipids, by altering and stabilizing membrane composition, by modulating genes and proteins, by improving mitochondrial function, by increasing antioxidant activity, and by enhancing cholinergic neurotransmission (Mescka et al. 2016; Jones et al. 2010). Previous findings demonstrated that LC exerts antioxidant and neuroprotective effects in quinolinic acid-induced prooxidant and 3-nitropropionic induced deficient metabolic models (Silva-Adaya et al. 2008; Sitta et al. 2009a). LC neuroprotective effects can be due to its antioxidant properties or to the facilitation of long-chain fatty acid transport into the mitochondria to produce energy through  $\beta$ -oxidation. Since this latter process is not used in the brain, which depends nearly exclusively on glucose (glycolysis) for its energetic needs, rather than on fatty acids, it may be hypothesized that the antioxidant activities of LC are more important to explain its neuroprotection. It is important to remember, that LC is easily transported through the blood-brain barrier by the carnitine/organic cation transporter (OCTN2) and accumulates in neural cells, especially as acetyl-L-carnitine (Kano et al. 2009; Ribas et al. 2014).

Recently, DNA damage was described in leukocytes from phenylketonuric patients (Sitta et al. 2009b) and it was also reported that *in vitro* concomitant treatment with LC was capable to reduce Phe-induced DNA damage (Deon et al. 2015a). Therefore, we studied DNA damage caused by Phe and its metabolites in white blood cells from healthy individuals. Both concentrations of Phe (600 and 1200  $\mu\text{M}$ ), PAA (5 and 10  $\mu\text{M}$ ), PLA (10 and 20  $\mu\text{M}$ ), PPA (10 and 15  $\mu\text{M}$ ) and in two concentration ranges (Phe 600  $\mu\text{M}$  + PAA 5  $\mu\text{M}$  + PLA 10  $\mu\text{M}$  + PPA 10  $\mu\text{M}$  and Phe 1200  $\mu\text{M}$  + PAA 10  $\mu\text{M}$  +

PLA 20  $\mu\text{M}$  + PPA 15  $\mu\text{M}$ ) tested have resulted in DNA damage index significantly higher than the control group. We verified that the higher tested concentrations presented greater levels of DNA migration. Supporting the data found in glial cells, DNA damage in leukocytes induced by PPA is higher than damage induced by others metabolites. It is possible to observe that the difference was caused by the increased number of cells that presented DNA damage class type 2 when exposed to PPA, while PAA and PLA presented DNA damage class type 1 (data not shown). On the other hand, Phe and its metabolites together presented cells DNA damage class type 3 and 4, which did not occur for PPA.

Once Phe and its metabolites caused DNA damage in leukocytes, we tested the in vitro effect of LC in two concentrations (30 and 100  $\mu\text{M}$ ) upon the DNA damage induced synergically by the compounds. Co-treatment with LC 30  $\mu\text{M}$  resulted in decreased DI only in the lowest concentrations. Already the co-treatment with LC 100  $\mu\text{M}$  resulted in decreased DI in both concentration ranges. It is known that LC concentrations between 20 and 60  $\mu\text{M}$  are often observed in blood of PKU patients on diet and LC supplementation (Sitta et al. 2011). Recently, using in vitro studies, it was observed that LC at concentrations over 60  $\mu\text{M}$  was able to reduce DNA damage induced by organic acids (Ribas et al. 2011) and LC at concentrations 15, 30, 120 and 150  $\mu\text{M}$  was able to reduce DNA damage induced by Phe 1000 and 1500  $\mu\text{M}$  in human leukocytes (Deon et al. 2015a). Previous studies in human and animal have suggested an antioxidant and a free radical scavenger role for LC (Gülcin 2006; Ribas et al. 2014). In addition, it was demonstrated that LC accelerates the disappearance of DNA single-strand breaks induced by oxygen radicals and alkylating agents in human peripheral blood lymphocytes (Boerrigter et al. 1993). LC has also been related to increase DNA repair enzyme (Moretti et al. 2002), which could explain its protective effect. Then, it is plausible to propose that LC may diminish DNA damage induced by Phe and its metabolites by reactive species reduction.

Also, in our study, the generation of reactive oxygen species was measured by  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  oxidation assay. ROS levels were significantly increased in glial cells pre-treated with Phe, PAA, PLA or PPA and in the pre-treatment with Phe and its metabolites together, compared with the native glial cells. It is possible to observe that Phe 300  $\mu\text{M}$  and PAA 4  $\mu\text{M}$  induced the highest ROS concentrations. Additionally, pre-treatment with LC 60  $\mu\text{M}$  was capable to reduce ROS generation

induced by Phe, PAA, PLA (only in the lowest concentration tested) and by both Phe and metabolites together. LC (60  $\mu$ M) did not reduce ROS production induced by PPA. LC directly scavenges free radicals and chelates metal ions that participate in reactive species reactions (Gulçin 2006; Ribas et al. 2014), therefore, it is plausible propose that LC can inhibit the H<sub>2</sub>DCF-DA oxidation that are triggered by reactive oxygen species. Additionally, markers of lipid, protein, and DNA oxidative damage and reduced antioxidant status have been reported in experimental models and patients with PKU (Sirtori et al. 2005; Sitta et al. 2006, 2009a, 2011; Fernandes et al. 2010; Simon et al. 2013; Deon et al. 2015a, b), probably secondary to the high production of free radicals.

Therefore, our study shows experimental evidence that oxidative stress occurs in PKU and may be induced by Phe and its metabolites that are able to promote DNA damage in glial cells and leukocytes by increased free radical production. Our data shows evidence for the first time in literature that LC treatment reduces DNA damage and ROS generation at peripheral and central level induced by Phe, PAA, PLA and PPA, possibly due to its antioxidant properties, indicating a possible neuroprotective role for LC. Considering that the current treatment of phenylketonuric patients involves a protein restricted diet that causes antioxidant deficiencies, a supplementation with LC may be considered a suitable adjuvant therapy for these patients in order to avoid the neuronal damage.

### **Acknowledgements**

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA).

### **Conflict of interest disclosure**

All authors declare that they have no conflict of interest.

### **Ethical statement**

The study was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (number 2018-0527).

## References

- Abdul HM, Butterfield DA (2007) Involvement of PI3K/PKG/ ERK1/2 signaling pathways in cortical neurons to trigger protection by cotreatment of acetyl-L-carnitine and alpha-lipoic acid against HNE-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 42: 371-384
- Acosta PB (1996) Nutrition studies in treated infants and children with phenylketonuria: vitamins, minerals, trace elements. *Eur J Pediatr* 155:136-139
- Agarwal A, Said TM (2004) Carnitines and male infertility. *Reprod Biomed Online* 8(4):376-384
- Anderson PJ, Wood SJ, Francis DE, Coleman L, Anderson V, Boneh A (2007) Are neuropsychological impairments in children with early-treated phenylketonuria (PKU) related to white matter abnormalities or elevated phenylalanine levels? *Dev Neuropsychol* 32(2): 645-668
- Artuch R, Vilaseca MA, Moreno J, Lambruschini N, Cambra FJ, Campistol J (1999) Decreased serum ubiquinone-10 concentration in phenylketonuria. *Am J Clin Nutr* 70:892-895
- Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL (2010) Phenylketonuria. *Lancet* 376(9750):1417-1427
- Boerrigter ME, Franceschi C, Arrigoni-Martelli E, Wei JY, Vijg J (1993) The effect of L-carnitine and acetyl-L-carnitine on the disappearance of DNA single-strand breaks in human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis* 14(10):2131-2136
- Bremer J (1983) Carnitine metabolism and functions. *Physiol Rev* 63:1420-1480
- Casey L (2013) Caring for children with phenylketonuria. *Can Fam Physician* 59(8):837-840
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 17:1195-1214

- de Groot MJ, Sijens PE, Reijngoud DJ, Paans AM, van Spronsen FJ (2015) Phenylketonuria: brain phenylalanine concentrations relate inversely to cerebral protein synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 35(2):200-205
- Deon M, Landgraf SS, Lamberty JF, Moura DJ, Saffi J, Wajner M, Vargas CR (2015a) Protective effect of L-carnitine on Phenylalanine-induced DNA damage. *Metab Brain Dis* 30:925-933
- Deon M, Sitta A, Faverzani JL, Guerreiro GB, Donida B, Marchetti DP, Mescka CP, Ribas GS, Coitinho AS, Wajner M, Vargas CR (2015b) Urinary biomarkers of oxidative stress and plasmatic inflammatory profile in phenylketonuric treated patients. *Int J Devl Neuroscience* 47:259–265
- Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J (2000) Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 267:4912–4916
- Fernandes CG, Leipnitz G, Seminotti B, Amaral AU, Zanatta A, Vargas CR, Dutra Filho CS, Wajner M (2010) Experimental evidence that phenylalanine provokes oxidative stress in hippocampus and cerebral cortex of developing rats. *Cell Mol Neurobiol* 30:317–326
- Fischer GM, Nemeti B, Farkas V, Debreceni B, Laszlo A, Schaffer Z, Somogyi C, Sandor A (2000) Metabolism of carnitine in phenylacetic acid-treated rats and in patients with phenylketonuria. *Biochim Biophys Acta* 1501(2-3):200-210
- Foster DW (2004) The role of the carnitine system in human metabolism. *Ann NY Acad Sci* 1033:1-16
- Gazit V, Ben-Abraham R, Pick CG, Katz Y (2003) beta-Phenylpyruvate induces long term neurobehavioral damage and brain necrosis in neonatal mice. *Behav Brain Res* 143(1):1-5
- Ghozlan A, Varoquaux O, Abadie V (2004) Is monoamine oxydase-B a modifying gene and phenylethylamine a harmful compound in phenylketonuria? *Mol Genet Metab* 83(4):337–340

Guerreiro G, Faverzani J, Jacques CED, Marchetti DP, Sitta A, de Moura Coelho D, Kayser A, Kok F, Athayde L, Manfredini V, Wajner M, Vargas CR (2018) Oxidative damage in glutaric aciduria type I patients and the protective effects of L-carnitine treatment. *J Cell Biochem* 119(12):10021-10032

Gülcin I (2006) Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci* 78:803–811

Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) Oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. In: Halliwell B, Gutteridge JMC (eds) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford, pp 246-350

Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR (2003) Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 18(1):45-51

Hendriksz CJ, Walter JH (2004) Update on phenylketonuria. *Curr Pediatr* 14:400-406

Jessen KR (2004) Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1861-1867

Jones LL, McDonald DA, Borum PR (2010) Acylcarnitines: role in brain. *Prog Lipid Res* 49:61-75

Kano T, Kato Y, Ito K, Ogihara T, Kubo Y, Tsuji A (2009) Carnitine/organic cation transporter OCTN2 (Slc22a5) is responsible for renal secretion of cephaloridine in mice. *Drug Metab Dispos* 37(5):1009-1016

Kaufman S (1989) An evaluation of the possible neurotoxicity of metabolites of phenylalanine. *J Pediatr* 114(5):895-900

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

Liao W, McNutt MA, Zhu WG (2009) The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods* 48:46-53



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

Mangoura D, Sakellaridis N, Jones J, Vernadakis A (1989) Early and late passage C-6 glial cell growth: similarities with primary glial cells in culture. *Neurochem Res* 14(10):941-947

Marchetti DP, Steffens L, Jacques CE, Guerreiro GB, Mescka CP, Deon M, de Coelho DM, Moura DJ, Viario AG, Poletto F, Coitinho AS, Jardim LB, Vargas CR (2018) Oxidative Imbalance, Nitrate Stress, and Inflammation in C6 Glial Cells Exposed to Hexacosanoic Acid: Protective Effect of N-acetyl-L-cysteine, Trolox, and Rosuvastatin. *Cell Mol Neurobiol* 38(8):1505-1516

McCord JM (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 108(8):652-659

Mescka CP, Rosa AP, Schirmbeck G, da Rosa TH, Catarino F, de Souza LO, Guerreiro G, Sitta A, Vargas CR, Dutra-Filho CS (2016) L-carnitine prevents oxidative stress in the brains of rats subjected to a chemically induced chronic model of MSUD. *Mol Neurobiol* 53(9):6007-6017

Moretti S, Famularo G, Marcellini S, Boschini A, Santini G, Trinchieri V, Lucci L, Alesse E, De Simone C (2002) L-carnitine reduces lymphocyte apoptosis and oxidant stress in HIV-1-infected subjects treated with zidovudine and didanosine. *Antioxid Redox Signal* 4(3):391-403

Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR (2001) A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem* 49(9):1183-1186

Oberdoerster J, Guizzetti M, Costa LG (2000) Effect of phenylalanine and its metabolites on the proliferation and viability of neuronal and astroglial cells: possible relevance in maternal phenylketonuria. *J Pharmacol Exp Ther* 295(1):295-301

Preissler T, Bristot IJ, Costa BM, Fernandes EK, Rieger E, Bortoluzzi VT, de Franceschi ID, Dutra-Filho CS, Moreira JC, Wannmacher CM (2016) Phenylalanine induces oxidative stress and decreases the viability of rat astrocytes: possible

relevance for the pathophysiology of neurodegeneration in phenylketonuria. *Metab Brain Dis* 31(3):529-537

Przyrembel H, Bremer HJ (2000) Nutrition, physical growth, and bone density in treated phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 159 (Suppl 2):S129-S135

Repetto G, del Peso A, Zurita JL (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 3(7):1125-1131

Ribas GS, Sitta A, Wajner M, Vargas CR (2011) Oxidative stress in phenylketonuria: what is the evidence?. *Cell Mol Neurobiol* 31(5): 653-662

Ribas GS, Vargas CR, Wajner M (2014) L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders. *Gene* 533(2):469-476

Rocha JC, Martins MJ (2012) Oxidative stress in phenylketonuria: future directions. *J Inherit Metab Dis* 35(3):381-398

Rosa AP, Jacques CE, Moraes TB, Wannmacher CM, Dutra Ade M, Dutra-Filho CS (2012) Phenylpyruvic acid decreases glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in rat brain. *Cell Mol Neurobiol* 32(7):1113-1118

Schulpis KH, Nounopoulos C, Scarpalezou A, Bouloukos A, Missiou-Tsagarakis S (1990) Serum carnitine level in phenylketonuric children under dietary control in Greece. *Acta Paediatr Scand* 79:930-934

Scriver CR, Kaufman S (2001) Hyperphenylalaninemias: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. chapter 77, 8th edn. McGraw-Hill Inc, New York, pp 1667-3301

Schoemans R, Aigrot MS, Wu C, Marée R, Hong P, Belachew S, Josse C, Lubetzki C, Bours V (2010) Oligodendrocyte development and myelinogenesis are not impaired by high concentrations of phenylalanine or its metabolites. *J Inherit Metab Dis* 33(2):113-120

Silva-Adaya D, Pérez-De La Cruz V, Herrera-Mundo MN, Mendoza-Macedo K, Villena-Hernández J, Binienda Z, Ali SF, Santamaría A (2008) Excitotoxic damage,

disrupted energy metabolism, and oxidative stress in the rat brain: antioxidant and neuroprotective effects of L-carnitine. *J Neurochem* 105:677-689

Simon KR, Dos Santos RM, Scaini G, Leffa DD, Damiani AP, Furlanetto CB, Machado JL, Cararo JH, Macan TP, Streck EL, Ferreira GC, Andrade VM, Schuck PF (2013) DNA damage induced by phenylalanine and its analogue p-chlorophenylalanine in blood and brain of rats subjected to a model of hyperphenylalaninemia. *Biochem Cell Biol* 91(5):319-324

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175(1):184-191

Sirtori LR, Dutra-Filho CS, Fitarelli D, Sitta A, Barschak AG, Wajner M, Coelho DM, Liesuy S, Belló-Klein A, Giugliani R, Deon M, Vargas CR (2005) Oxidative stress in patients with phenylketonuria. *Biochim Biophys Acta* 1740:68-73

Sitta A, Barschak AG, Deon M, Terroso T, Pires R, Giugliani R, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR (2006) Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. *Metab Brain Dis* 21:287-296

Sitta A, Barschak AG, Deon M, Barden AT, Biancini GB, Vargas PR, de Souza CF, Netto C, Wajner M, Vargas CR (2009a) Effect of short- and long-term exposition to high phenylalanine blood levels on oxidative damage in phenylketonuric patients. *Int J Dev Neurosci* 27:243–247

Sitta A, Manfredini V, Biasi L, Treméa R, Schwartz IV, Wajner M, Vargas CR (2009b) Evidence that DNA damage is associated to phenylalanine blood levels in leukocytes from phenylketonuric patients. *Mutat Res* 679:13-16

Sitta A, Barschak AG, Deon M, de Mari JF, Barden AT, Vanzin CS, Biancini GB, Schwartz IVD, Wajner M, Vargas CR (2009c) L-carnitine blood levels and oxidative stress in treated phenylketonuric patients. *Cell Mol Neurobiol* 29:211-218

Sitta A, Vanzin CS, Biancini GB, Manfredini V, de Oliveira AB, Wayhs CA, Ribas GO, Giugliani L, Schwartz IV, Bohrer D, Garcia SC, Wajner M, Vargas CR (2011)

Evidence that L-carnitine and selenium supplementation reduces oxidative stress in phenylketonuric patients. *Cell Mol Neurobiol* 31(3):429–436

Speit G, Hartmann A (1995) The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis* 10(6):555-559

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206-221

Trefz F, Maillot F, Motzfeldt K, Schwarz M (2011) Adult phenylketonuria outcome and management. *Mol Genet Metab* 104:S26-S30

Tuchman M, Fisch RO, Ramnaraine ML, Krivit W (1985) Acidic metabolites of phenylalanine in plasma of phenylketonurics. *Biochemical Medicine* 34(2):203-206

Van Spronsen FJ, Smit PG, Koch R (2001) Phenylketonuria: tyrosine beyond the phenylalanine-restricted diet. *J Inherit Metab Dis* 24:1-4

Vockley J, Andersson HC, Antshel KM, Braverman NE, Burton BK, Frazier DM, Mitchell J, Smith WE, Thompson BH, Berry SAA (2014) Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline. *Genet Med* 16(2):188-200

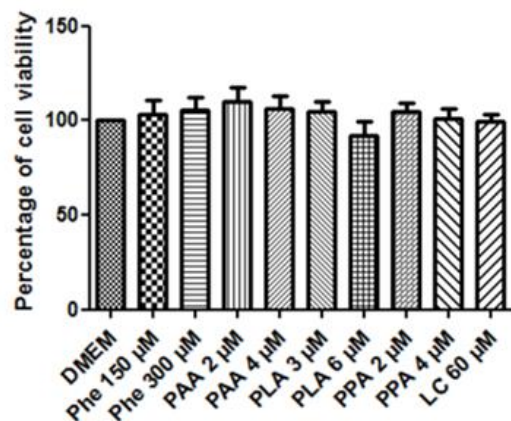
Wilke BC, Vidailhet M, Favier A, Guillemin C, Ducros V, Arnaud J, Richard MJ (1992) Selenium, glutathione peroxidase (GSH-Px) and lipid peroxidation products before and after selenium supplementation. *Clin Chim Acta* 207:137-142

Williams RA, Mamotte CD, Burnett JR (2008) Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. *Clin Biochem Rev* 29(1): 31-41

Zhang Y, Gu X, Yuan X (2007) Phenylalanine activates the mitochondria-mediated apoptosis through the RhoA/Rho-associated kinase pathway in cortical neurons. *Eur J Neurosci* 25(5):1341-8.

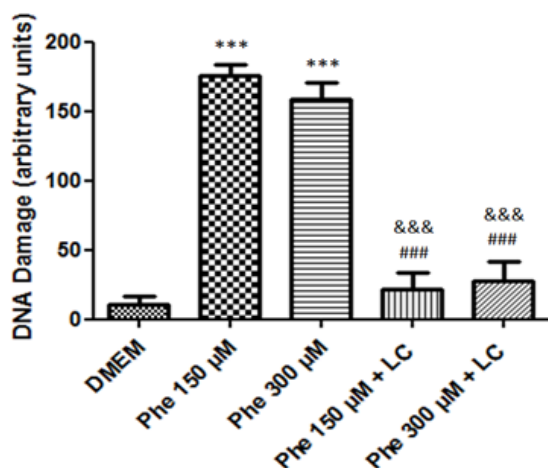
## Figure legends:

### Figure 1



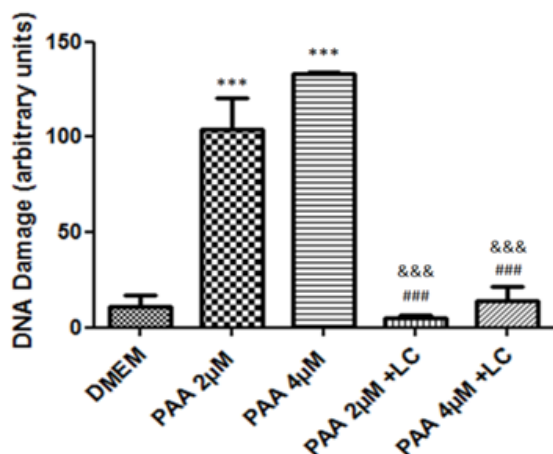
**Fig. 1** Neutral red viability assay in native glial cells (DMEM), glial cell with phenylalanine (Phe) 150 and 300 µM, glial cells with phenylacetic acid (PAA) 2 and 4 µM, glial cells with phenyllactic acid (PLA) 3 and 6 µM, glial cells with phenylpyruvic acid (PPA) 2 and 4 µM and glial cells with L-carnitine (LC) 60 µM. Results represent mean ± SEM (standard error of the mean). One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test

### Figure 2a



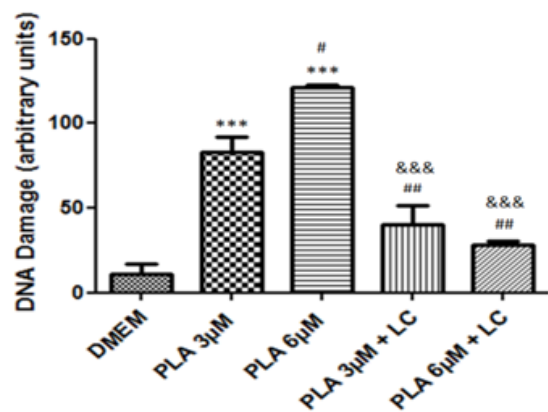
**Fig. 2a** DNA damage in native glial cells (DMEM), glial cell with phenylalanine (Phe) 150 and 300 µM, glial cell with Phe 150 and 300 µM treated with L-carnitine (LC) 60 µM. Results represent mean ± SEM (standard error of the mean). \*\*\*p<0.001 compared to DMEM group. ###p<0.001 compared to Phe 150 µM group. &&&p<0.001 compared to Phe 300 µM group. One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test

Figure 2b



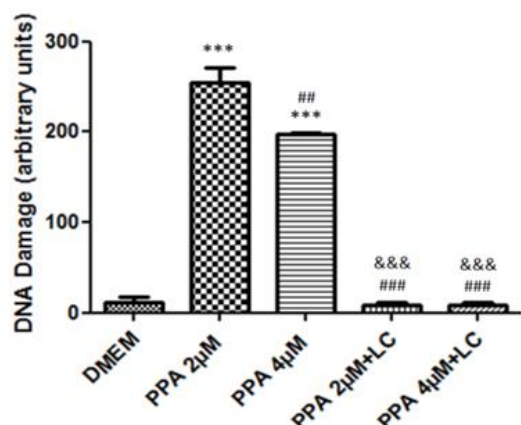
**Fig. 2b** DNA damage in native glial cells (DMEM), glial cell with phenylacetic acid (PAA) 2 and 4  $\mu\text{M}$ , glial cell with PAA 2 and 4  $\mu\text{M}$  treated with L-carnitine (LC) 60  $\mu\text{M}$ . Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \*\*\* $p < 0.001$  compared to DMEM group. ### $p < 0.001$  compared to PAA 2  $\mu\text{M}$  group. &&& $p < 0.001$  compared to PAA 4  $\mu\text{M}$  group. One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test

Figure 2c



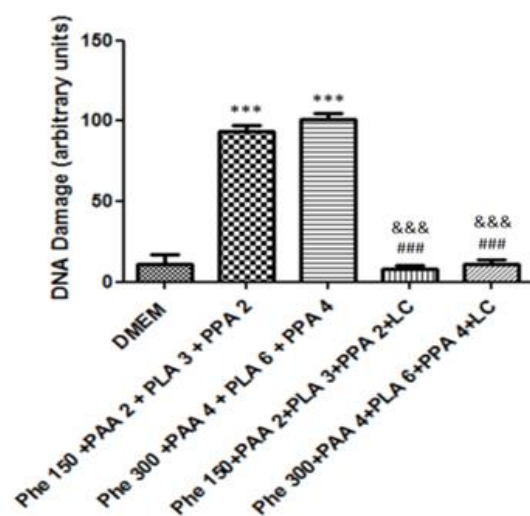
**Fig. 2c** DNA damage in native glial cells (DMEM), glial cell with phenyllactic acid (PLA) 3 and 6  $\mu\text{M}$ , glial cell with PLA 3 and 6  $\mu\text{M}$  treated with L-carnitine (LC) 60  $\mu\text{M}$ . Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \*\*\* $p < 0.001$  compared to DMEM group. # $p < 0.05$  and ## $p < 0.01$  compared to PLA 3  $\mu\text{M}$  group. &&& $p < 0.001$  compared to PLA 6  $\mu\text{M}$  group. One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test

Figure 2d

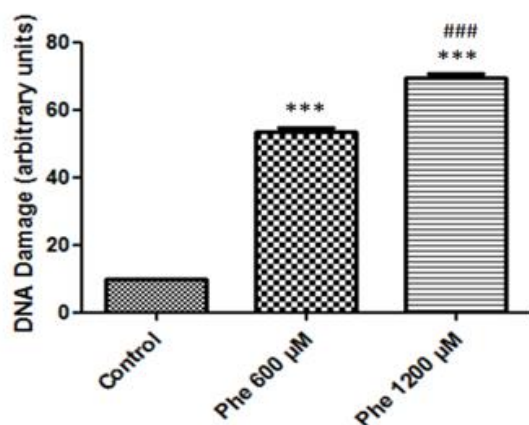


**Fig. 2d** DNA damage in native glial cells (DMEM), glial cell with phenylpyruvic acid (PPA) 2 and 4  $\mu\text{M}$ , glial cell with PPA 2 and 4  $\mu\text{M}$  treated with L-carnitine (LC) 60  $\mu\text{M}$ . Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \*\*\* $p < 0.001$  compared to DMEM group. ## $p < 0.01$  and ### $p < 0.001$  compared to PPA 2  $\mu\text{M}$  group. &&& $p < 0.001$  compared to PPA 4  $\mu\text{M}$  group. One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test

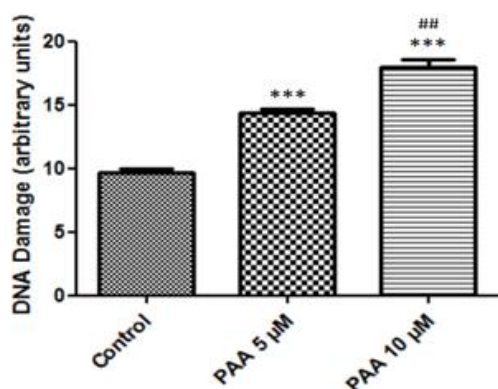
Figure 2e



**Fig. 2e** DNA damage in native glial cells (DMEM), glial cell with [Phe 150 and 300  $\mu\text{M}$ ] + [PAA 2 and 4  $\mu\text{M}$ ] + [PLA 3 and 6  $\mu\text{M}$ ] + [PPA 2 and 4  $\mu\text{M}$ ], glial cell with [Phe 150 and 300  $\mu\text{M}$ ] + [PAA 2 and 4  $\mu\text{M}$ ] + [PLA 3 and 6  $\mu\text{M}$ ] + [PPA 2 and 4  $\mu\text{M}$ ] treated with L-carnitine (LC) 60  $\mu\text{M}$ . Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \*\*\* $p < 0.001$  compared to DMEM group. ### $p < 0.001$  compared to [Phe 150  $\mu\text{M}$  + PAA 2  $\mu\text{M}$  + PLA 3  $\mu\text{M}$  + PPA 2  $\mu\text{M}$ ] group. &&& $p < 0.001$  compared to [Phe 300  $\mu\text{M}$  + PAA 4  $\mu\text{M}$  + PLA 6  $\mu\text{M}$  + PPA 4  $\mu\text{M}$ ] group. One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test

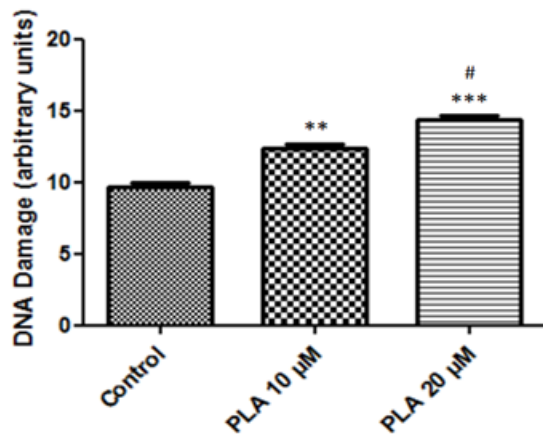
**Figure 3a**

**Fig. 3a** In vitro effect of phenylalanine (Phe) 600 and 1200 µM on DNA damage (comet assay) in leukocytes from whole blood of healthy subjects. Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \*\*\* $p < 0.001$  compared to control group. ### $p < 0.001$  compared to Phe 600 µM group. One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test

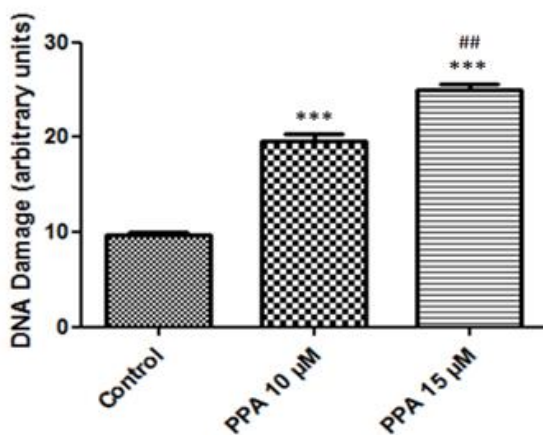
**Figure 3b**

**Fig. 3b** In vitro effect phenylacetic acid (PAA) 5 and 10 µM on DNA damage (comet assay) in leukocytes from whole blood of healthy subjects. Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \*\*\* $p < 0.001$  compared to control group. ## $p < 0.01$  compared to PAA 5 µM group. One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test



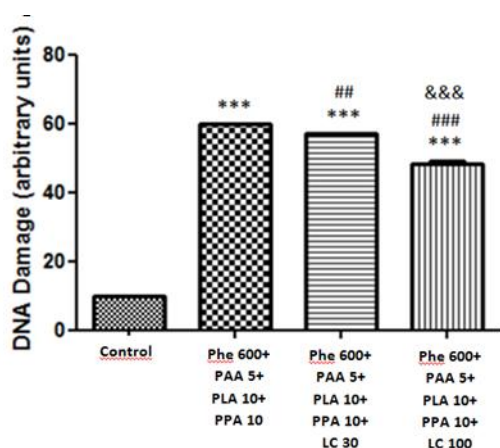
**Figure 3c**

**Fig. 3c** In vitro effect phenyllactic acid (PLA) 10 and 20 µM on DNA damage (comet assay) in leukocytes from whole blood of healthy subjects. Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  compared to control group. # $p < 0.05$  compared to PLA 10 µM group. One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test.

**Figure 3d**

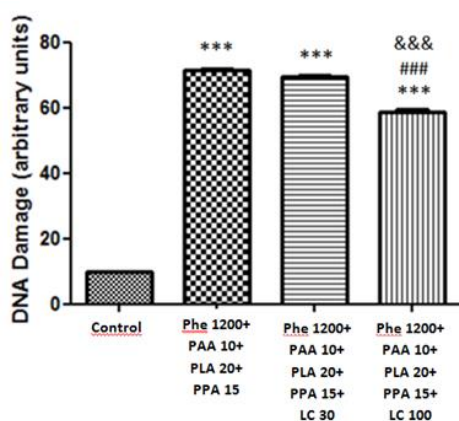
**Fig. 3d** In vitro effect phenylpyruvic acid (PPA) 10 and 15 µM on DNA damage (comet assay) in leukocytes from whole blood of healthy subjects. Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \*\*\* $p < 0.001$  compared to control group. ## $p < 0.01$  compared to PPA 10 µM group. One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test

Figure 3e



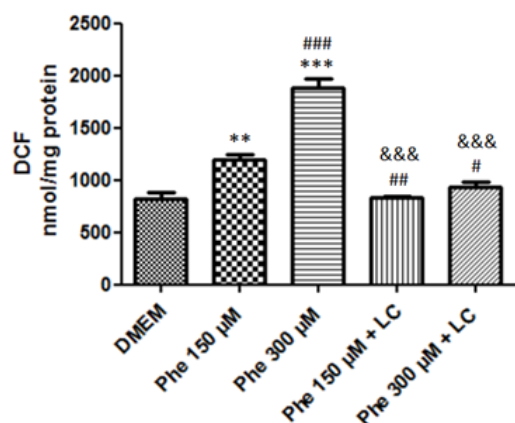
**Fig. 3e** In vitro effect of L-carnitine (LC) 30 and 100  $\mu\text{M}$  on DNA damage (comet assay) induced by [Phe 600  $\mu\text{M}$  + PAA 5  $\mu\text{M}$  + PLA 10  $\mu\text{M}$  + PPA 10  $\mu\text{M}$ ] in leukocytes from whole blood of healthy subjects. Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \*\*\* $p$ <0.001 compared to control group. ## $p$ <0.01 and ### $p$ <0.001 compared to [Phe 600  $\mu\text{M}$  + PAA 5  $\mu\text{M}$  + PLA 10  $\mu\text{M}$  + PPA 10  $\mu\text{M}$ ] group. &&& $p$ <0.001 compared to [Phe 600  $\mu\text{M}$  + PAA 5  $\mu\text{M}$  + PLA 10  $\mu\text{M}$  + PPA 10  $\mu\text{M}$  + LC 30  $\mu\text{M}$ ] group. One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test

Figure 3f



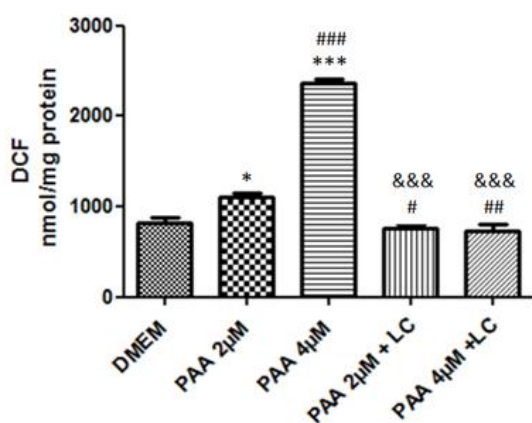
**Fig. 3f** In vitro effect of L-carnitine (LC) 30 and 100  $\mu\text{M}$  on DNA damage (comet assay) induced by [Phe 1200  $\mu\text{M}$  + PAA 10  $\mu\text{M}$  + PLA 20  $\mu\text{M}$  + PPA 15  $\mu\text{M}$ ] in leukocytes from whole blood of healthy subjects. Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \*\*\* $p$ <0.001 compared to control group. ### $p$ <0.001 compared to [Phe 1200  $\mu\text{M}$  + PAA 10  $\mu\text{M}$  + PLA 20  $\mu\text{M}$  + PPA 15  $\mu\text{M}$ ] group. &&& $p$ <0.001 compared to [Phe 1200  $\mu\text{M}$  + PAA 10  $\mu\text{M}$  + PLA 20  $\mu\text{M}$  + PPA 15  $\mu\text{M}$  + LC 30  $\mu\text{M}$ ] group. One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test

Figure 4a



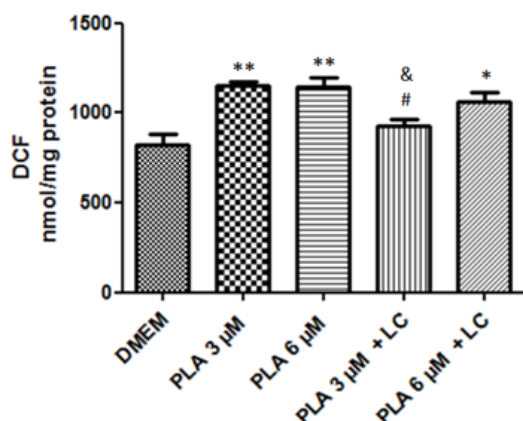
**Fig. 4a** Reactive oxygen species content in native glial cells (DMEM), glial cell with phenylalanine (Phe) 150 and 300  $\mu\text{M}$ , glial cell with Phe 150 and 300  $\mu\text{M}$  treated with L-carnitine (LC) 60  $\mu\text{M}$ . Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  compared to DMEM group. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  and ### $p < 0.001$  compared to Phe 150  $\mu\text{M}$  group. &&& $p < 0.001$  compared to Phe 300  $\mu\text{M}$  group. One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test

Figure 4b



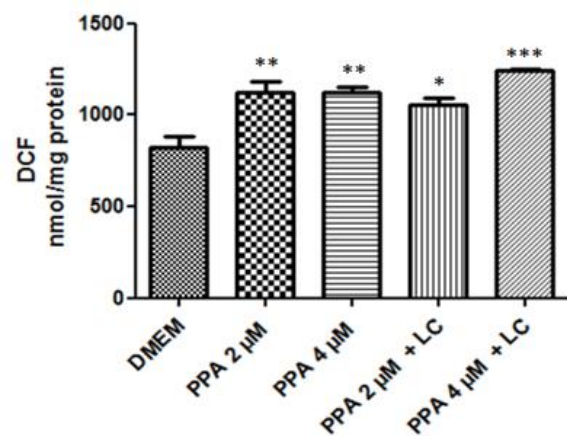
**Fig. 4b** Reactive oxygen species content in native glial cells (DMEM), glial cell with phenylacetic acid (PAA) 2 and 4  $\mu\text{M}$ , glial cell with PAA 2 and 4  $\mu\text{M}$  treated with L-carnitine (LC) 60  $\mu\text{M}$ . Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$  compared to DMEM group. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  and ### $p < 0.001$  compared to PAA 2  $\mu\text{M}$  group. &&& $p < 0.001$  compared to PAA 4  $\mu\text{M}$  group. One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test

Figure 4c



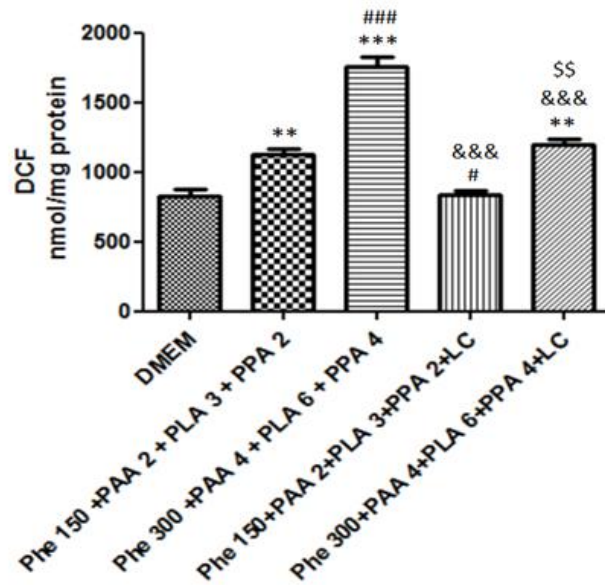
**Fig. 4c** Reactive oxygen species content in native glial cells (DMEM), glial cell with phenyllactic acid (PLA) 3 and 6  $\mu$ M, glial cell with PLA 3 and 6  $\mu$ M treated with L-carnitine (LC) 60  $\mu$ M. Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.01 compared to DMEM group. # $p$ <0.05 compared to PLA 3  $\mu$ M group. & $p$ <0.05 compared to PLA 6  $\mu$ M group. One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test

Figure 4d



**Fig. 4d** Reactive oxygen species content in native glial cells (DMEM), glial cell with phenylpyruvic acid (PPA) 2 and 4  $\mu$ M, glial cell with PPA 2 and 4  $\mu$ M treated with L-carnitine (LC) 60  $\mu$ M. Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 and \*\*\* $p$ <0.001 compared to DMEM group. One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test

Figure 4e



**Fig. 4e** Reactive oxygen species content in native glial cells (DMEM), glial cell with [Phe 150 and 300  $\mu\text{M}$ ] + [PAA 2 and 4  $\mu\text{M}$ ] + [PLA 3 and 6  $\mu\text{M}$ ] + [PPA 2 and 4  $\mu\text{M}$ ], glial cell with [Phe 150 and 300  $\mu\text{M}$ ] + [PAA 2 and 4  $\mu\text{M}$ ] + [PLA 3 and 6  $\mu\text{M}$ ] + [PPA 2 and 4  $\mu\text{M}$ ] treated with L-carnitine (LC) 60  $\mu\text{M}$ . Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  compared to DMEM group. # $p < 0.05$  and ### $p < 0.001$  compared to [Phe 150  $\mu\text{M}$  + PAA 2  $\mu\text{M}$  + PLA 3  $\mu\text{M}$  + PPA 2  $\mu\text{M}$ ] group. &&& $p < 0.001$  compared to [Phe 300  $\mu\text{M}$  + PAA 4  $\mu\text{M}$  + PLA 6  $\mu\text{M}$  + PPA 4  $\mu\text{M}$ ] group. \$\$ $p < 0.01$  compared to [Phe 150  $\mu\text{M}$  + PAA 2  $\mu\text{M}$  + PLA 3  $\mu\text{M}$  + PPA 2  $\mu\text{M}$  + LC 60  $\mu\text{M}$ ] group. One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test



## **5. DISCUSSÃO**

---





Os EIM são doenças metabólicas de origem genética, em que a deficiência na atividade de uma enzima provoca o bloqueio de uma rota bioquímica e, com isso, ocorre o acúmulo de substratos e seus derivados e a diminuição dos produtos gerados (SCRIVER *et al.*, 2001). Conforme Saudubray e Charpentier (2001), os EIM podem ser classificados em três grandes grupos, de acordo com a área do metabolismo afetada. Um destes grupos é composto pelos EIM intermediário, caracterizados pelo acúmulo de componentes tóxicos e de metabólitos, provenientes do bloqueio das rotas metabólicas e relacionados à ingestão alimentar.

Fazem parte deste grupo as aminoacidopatias, acidemias orgânicas, defeitos no ciclo da ureia e as intolerâncias aos açúcares. Entre as aminoacidopatias, a PKU é a mais prevalente (MIRA e MARQUEZ, 2000) e caracteriza-se pela deficiência na atividade da enzima PAH, que catalisa a hidroxilação da Phe em Tyr. Quando ocorre o bloqueio da rota principal do catabolismo deste aminoácido, os pacientes apresentam altas concentrações de Phe e seus produtos ácidos fenilpirúvico, fenilacético e fenilacético nos tecidos e líquidos biológicos, que é sabido estar relacionado com o retardo mental progressivo na doença (SCRIVER, 2001). Esses metabólitos são compostos que normalmente não são produzidos em quantidades detectáveis na presença da enzima PAH e, por isso, não detectados em indivíduos normais, mas se encontram aumentados em pacientes PKU.

Mesmo após muitos estudos em pacientes e também em modelos animais, os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela neurotoxicidade observada na doença ainda não estão completamente elucidados (SIERRA *et al.*, 1998; KIENZLE HAGEN *et al.*, 2002; ERCAL *et al.*, 2002; SITTA *et al.*, 2009a; DE GROOT *et al.*, 2010). Importante salientar que parece não se tratar de apenas um mecanismo neurotóxico, mas um somatório deles, responsável pelas alterações no SNC dos pacientes fenilcetonúricos.

Neste contexto, o EO vem sendo proposto como um dos mecanismos responsáveis pelo dano cerebral na PKU. Ultimamente, o papel do EO em doenças neurodegenerativas tem recebido muita atenção, visto que o cérebro é extremamente suscetível à ação das espécies reativas. Isso se deve ao alto consumo de oxigênio, ao alto conteúdo de lipídeos poliinsaturados, ao alto conteúdo de ferro e ao baixo conteúdo de defesas antioxidantes em algumas áreas particulares do cérebro (HALLIWELL, 1996).

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, demonstraram que pacientes fenilcetonúricos no momento do diagnóstico (tardio), apresentavam no sangue uma indução da lipoperoxidação, bem como uma diminuição da reatividade antioxidante total (TAR) e da atividade da enzima GPx (SIRTORI *et al.*, 2005). Em seguimento a este trabalho, verificou-se que os pacientes com PKU, já em tratamento dietético, permaneciam com as mesmas alterações na peroxidação lipídica e na redução de antioxidantes, e que estas alterações não estavam diretamente relacionadas com os níveis séricos de Phe (SITTA *et al.*, 2006). Sitta e colaboradores (2009a) também mostraram que a exposição a altas concentrações de Phe por um curto ou longo período de tempo resulta em uma redução das defesas antioxidantes, enquanto o dano oxidativo a proteínas e lipídios ocorre apenas em pacientes expostos por longo tempo a altas concentrações de Phe (diagnóstico tardio).

Nesse sentido, estudos já demonstraram que uma dieta restrita em Phe previne a instalação dos sintomas neurológicos quando iniciada logo após o nascimento, indicando que não é a deficiência na atividade enzimática, mas a hiperfenilalaninemia e/ou o acúmulo dos metabólitos que causam os danos cerebrais na PKU (SCHULPIS *et al.*, 2004; GASSIÓ *et al.*, 2008). Por outro lado, a terapia com restrição protéica às quais os pacientes são submetidos e que precisam seguir ao longo da vida, poderiam diminuir a disponibilidade de antioxidantes, reduzindo a sua concentração no organismo (ARTUCH *et al.*, 2004; SCHULPIS *et al.*, 2005; SIRTORI *et al.*, 2005; SITTA *et al.*, 2006).

Desta forma, estudos prévios mostraram que uma dieta restrita em Phe por pacientes PKU leva a redução na concentração de selênio, um cofator essencial para a atividade da GPx, além da diminuição do *status* antioxidante total (TAS) (VAN BAKEL *et al.*, 2000) e que a suplementação de selênio nos pacientes, normalizou a atividade da enzima (WILKE *et al.*, 1992). Por sua vez, Artuch e colaboradores (2004) verificaram que a ubiquinona-10 (Q-10), um antioxidante natural, estava reduzida nos pacientes PKU tratados, devido a baixa ingestão dietética de proteínas pelos pacientes. Sitta e colaboradores (2011) verificaram que em pacientes a suplementação com LC e selênio foi capaz de reverter a peroxidação lipídica e o dano oxidativo protéico, reforçando a importância desses compostos antioxidantes na PKU, visto que a deficiência de LC tem sido descrita em pacientes fenilcetonúricos submetidos à dieta protéica restrita (SITTA *et al.*, 2009a; SCHULPIS

*et al.*, 1990). Estudos em modelos animais verificaram que a melatonina e as vitaminas C e E, revertem a lipoperoxidação em filhotes de ratos PKU (MARTINEZ-CRUZ *et al.*, 2002). Complementando os demais estudos, o ácido lipóico reverteu a atividade reduzida de enzimas antioxidantes, bem como aumentou os níveis de defesas antioxidantes provocadas *in vitro* e *in vivo* por um modelo quimicamente induzido de HPA no cérebro de ratos (MORAES *et al.*, 2010). Assim, o estudo do possível efeito protetor de uma terapia com antioxidante na PKU pode levar a resultados benéficos na terapêutica dos pacientes.

Assim, esse estudo visa ampliar os conhecimentos sobre o envolvimento do EO na neurotoxicidade da PKU bem como avaliar o possível papel antioxidante da LC. Considerando que ainda não se sabe como as células cerebrais reagem ao acúmulo de Phe e seus metabólitos, iniciamos com a investigação *in vitro* de dano ao DNA pela Phe e seus metabólitos: PAA, PLA e PPA em cultura de células gliais C6, através do ensaio cometa, na presença e ausência da LC. Importante ressaltar que a literatura descreve poucos estudos que abordem especificamente dano ao DNA na PKU, bem como a sua possível relação com o aumento tecidual dos níveis de Phe e dos seus metabólitos.

As células da glia fornecem suporte e nutrição aos neurônios e mantêm concentrações adequadas de íons e neurotransmissores no ambiente neuronal. Desta forma, e pela sua capacidade de remover potencialmente aminoácidos citotóxicos, os astrócitos são provavelmente importantes reguladores de muitos processos patológicos (JESSEN, 2004). Está bem documentado que as células gliais C6 possuem analogia funcional aos astrócitos normais e, portanto, são usadas como modelo confiável de astrócitos em estudos *in vitro* sobre a resposta ao estresse oxidativo na presença de compostos redox-ativos (SLAMON e PENTREATH, 2000; LIN *et al.*, 2014; VIDA K *et al.*, 2015).

O ensaio cometa é uma técnica simples, sensível e de baixo custo que analisa de forma individualizada as células, quantificando as lesões e detectando os efeitos de reparo no DNA (SINGH *et al.*, 1988). Os danos mais facilmente encontrados no DNA são quebras de fita simples ou duplas, danos álcali-lábeis, *crosslinks* e fragmentos resultantes de reparo por excisão (COLLINS, 2014). Uma vez que podem ser utilizados diversos tipos de células e um pequeno número das mesmas, e que não necessitam estar em divisão, o ensaio cometa possui vantagens em relação a técnicas citogenéticas e bioquímicas (SINGH *et al.*, 1988; TICE e

STRAUSS, 1995). Uma variedade de lesões no DNA pode ocorrer pela indução de espécies reativas, incluindo bases oxidadas, sítios abásicos, quebras de cadeias de DNA e ligações cruzadas entre o DNA e as proteínas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Importante ressaltar que foi realizado o ensaio de citotoxicidade pela técnica do vermelho neutro, onde foi possível concluir que a Phe (150 e 300  $\mu\text{M}$ ), PAA (2 e 4  $\mu\text{M}$ ), PLA (3 e 6  $\mu\text{M}$ ) e PPA (2 e 4  $\mu\text{M}$ ), e LC (60  $\mu\text{M}$ ) não prejudicaram o crescimento celular das células gliais, pois todos os grupos estudados apresentaram uma porcentagem de viabilidade celular de aproximadamente 100%.

Assim, inicialmente tratamos as células gliais em cultura com duas concentrações diferentes de Phe (150 e 300  $\mu\text{M}$ ), PAA (2 e 4  $\mu\text{M}$ ), PLA (3 e 6  $\mu\text{M}$ ) ou PPA (2 e 4  $\mu\text{M}$ ), que são os metabólitos tóxicos que se acumulam na PKU. Com a ideia de “mimetizar” o que ocorre nos tecidos dos pacientes fenilcetonúricos, também tratamos as células gliais com a Phe e seus metabólitos juntos, em duas faixas de concentração, sendo um dos conjuntos com as concentrações mais baixas (Phe 150  $\mu\text{M}$  + PAA 2  $\mu\text{M}$  + PLA 3  $\mu\text{M}$  + PPA 2  $\mu\text{M}$ ) e a outra com as concentrações mais altas (Phe 300  $\mu\text{M}$  + PAA 4  $\mu\text{M}$  + PLA 6  $\mu\text{M}$  + PPA 4  $\mu\text{M}$ ). As concentrações foram escolhidas tendo como base os estudos realizados por de Groot e colaboradores (2015) para Phe e Tuchman e colaboradores (1985) para PAA, PLA e PPA, onde verificamos que a concentração de Phe e seus metabólitos no plasma seria, aproximadamente, cinco vezes maior do que a concentração no tecido cerebral. Constatamos que em ambas as concentrações de Phe houve um aumento do índice de dano (DI) ao DNA quando comparado ao grupo controle (células gliais nativas). Resultado semelhante foi encontrado para os metabólitos PAA, PLA e PPA e para o conjunto da Phe e seus metabólitos, quando comparados as células gliais nativas.

Observamos que a indução ao dano ao DNA pelo PPA parece ser mais proeminente do que o dano induzido pelos demais metabólitos, sendo que essa diferença pode ter sido causada pelo aumento significativo de células com índice de dano 2, 3 e 4, enquanto os demais metabólitos induziram majoritariamente índice de dano 1 e 2 (dados não mostrados). Curiosamente, foi possível verificar que no conjunto da Phe e seus metabólitos, em ambas as faixas de concentração analisadas, verificamos perfis de dano ao DNA muito semelhante ao dos demais metabólitos testados separadamente, com classe de dano 1 e 2 (dados não

mostrados). Nossos resultados estão de acordo com Simon *et al.* (2013) que verificaram dano ao DNA no córtex cerebral e no sangue de ratos submetidos a Phe *in vivo* e *in vitro*.

A administração de PPA em camundongos recém-nascidos foi capaz de induzir necrose cerebral acompanhada de disfunção neurocomportamental (GRAZIT, 2003). Kaufman (1989) relatou que Phe, PAA e PPA causaram toxicidade na cultura mielinizante de cerebelo de ratos neonatos estudados, mas em concentrações elevadas de 4 a 6 mmol/L. Contudo, Schoemans e colaboradores (2010) não detectaram citotoxicidade direta em oligodendrócitos primários cultivados na presença de altas concentrações de Phe, PAA e PPA.

Nós avaliamos também o efeito *in vitro* da LC 60  $\mu$ M sobre danos ao DNA causado pela Phe, PAA, PLA e PPA em células gliais cultivadas nas mesmas condições e concentrações testadas anteriormente. O pré-tratamento com LC 60  $\mu$ M quando adicionado às células gliais, foi capaz de prevenir o dano ao DNA induzido pela Phe e seus metabólitos separadamente e também em conjunto a nível de controle, em todas as concentrações testadas. Importante ressaltar que a concentração de LC usada neste estudo teve como base estudo anterior de Mescka e colaboradores (2016), onde a concentração de LC no córtex e cerebelo de ratos após serem submetidos a administração intraperitoneal de 100 mg/kg peso corporal de LC foi de  $71,85 \pm 4,32 \mu\text{mol/L}$  e  $75,21 \pm 7,50 \mu\text{mol/L}$ , respectivamente.

É plausível propor que LC pode diminuir o dano ao DNA induzido pela Phe e pelos seus metabólitos pela redução na geração de ERO. Em acordo, foi mostrado que a peroxidação de lipídeos e proteínas foi diminuída em pacientes com PKU após a suplementação com LC (SITTA *et al.*, 2009a). Mescka e colaboradores (2014) verificaram que a leucina e o cetoácido correspondente induziram dano ao DNA *in vitro* em leucócitos humanos e que LC foi capaz de diminuir significativamente essas alterações. Quando o efeito da suplementação de LC foi testado em pacientes com doença da urina do xarope do bordo sobre o dano ao DNA, foi observada uma diminuição significativa do dano previamente apresentado (MESCKA *et al.*, 2015). LC também foi relacionada ao aumento de enzimas de reparo do DNA (RIBAS *et al.*, 2014; MORETTI *et al.*, 2002), o que poderia explicar o seu efeito neuroprotetor sobre o dano ao DNA induzido pela Phe e seus metabólitos.

Nos últimos anos, diversos estudos têm investigado os diferentes papéis organismo seja garantir o transporte de ácidos graxos de cadeia longa para dentro

da mitocôndria para que possam ser oxidados, diversos estudos têm demonstrado que a LC desempenha um papel de proteção contra as ERO. Esse papel é resultado principalmente do sequestro de radicais hidroxila e a inibição da formação destes radicais na reação de Fenton (DERIN *et al.*, 2004).

Os efeitos benéficos da LC parecem ser mediados, pelo menos em parte, por suas propriedades antioxidantes. A LC tem sido descrita como um sequestrador de radicais superóxido (GULÇIN, 2006). Por sua vez, os radicais superóxido desempenham um importante papel na formação de outros ERO, como o peróxido de hidrogênio e os radicais hidroxila, os quais induzem dano oxidativo a lipídios, proteínas e DNA (PIETA, 2000). Também tem sido descrito que a LC seria capaz de sequestrar o peróxido de hidrogênio e os radicais hidroxila (considerados os mais deletérios ao organismo) (REZNICK e PACKER, 1993; GULÇIN, 2006; DERIN *et al.*, 2004). Além disso, a LC também apresenta um efeito antiperoxidativo que está relacionado à sua ação como um quelante de metais (MUTHUSWAMY *et al.*, 2006) que leva a uma diminuição na concentração de íons metálicos e, conseqüentemente, na geração de RL.

Seguindo nosso estudo, e tendo em vista que o dano ao DNA já foi descrito em leucócitos de pacientes fenilcetonúricos (SITTA *et al.*, 2009b) e que foi relatado que o tratamento concomitante *in vitro* com LC foi capaz de reduzir o dano ao DNA induzido pela Phe (DEON *et al.*, 2015a), também investigamos através do ensaio cometa em leucócitos de indivíduos saudáveis, o efeito *in vitro* de duas diferentes concentrações de Phe (600 e 1200  $\mu\text{M}$ ), bem como do PAA (5 e 10  $\mu\text{M}$ ), do PLA (10 e 20  $\mu\text{M}$ ) ou do PPA (10 e 15  $\mu\text{M}$ ), assim como o efeito conjunto da Phe e de seus metabólitos em duas faixas de concentração (Phe 600  $\mu\text{M}$  + PAA 5  $\mu\text{M}$  + PLA 10  $\mu\text{M}$  + PPA 10  $\mu\text{M}$  e Phe 1200  $\mu\text{M}$  + PAA 10  $\mu\text{M}$  + PLA 20  $\mu\text{M}$  + PPA 15  $\mu\text{M}$ ), seguindo a mesma ideia do ensaio com as células gliais, o de “mimetizar” as concentrações encontradas no sangue de pacientes com PKU.

Nossos resultados mostraram que tanto a Phe como seus metabólitos, separadamente e em conjunto, foram capazes de aumentar significativamente, em comparação ao grupo controle, o dano ao DNA induzido *in vitro* nos leucócitos periféricos humanos. Observamos que a indução de dano ao DNA pela Phe e seus metabólitos é mais proeminente nas maiores concentrações testadas, e que a Phe parece ser a maior causadora de dano ao DNA nos leucócitos.

Sitta *et al.* (2009b) observaram que a adição de concentrações crescentes de Phe ao meio de células sanguíneas, produziu um DI crescente no ensaio cometa, até a concentração de 1000  $\mu\text{mol/L}$  e que concentrações de Phe de 250  $\mu\text{mol/L}$  já foram capazes de produzir dano significativo ao DNA. Em estudo semelhante, Deon *et al.* (2015a), relataram que a adição de Phe, tanto na concentração de 1000  $\mu\text{M}$  quanto na de 2500  $\mu\text{M}$ , em leucócitos de indivíduos saudáveis, induziu *in vitro* um aumento significativo de dano ao DNA em comparação ao grupo controle. É importante salientar que uma das metas a serem atingidas no tratamento da PKU é a manutenção dos níveis sanguíneos de Phe inferiores a 360  $\mu\text{mol/L}$ , porém concentrações abaixo de 600  $\mu\text{mol/L}$  são consideradas aceitáveis. Entretanto, sabe-se que, seja no diagnóstico, na ausência de terapia e/ou em pacientes não aderentes ao tratamento, os pacientes com PKU apresentam no sangue concentrações elevadas de Phe que podem variar de 1000 a 2500  $\mu\text{mol/L}$  (WILLIAMS *et al.*, 2008; TREFZ *et al.*, 2011).

Os resultados acima apresentados corroboram com um estudo *in vivo* sobre o dano ao DNA em pacientes com PKU que revelou que pacientes com níveis sanguíneos de Phe bastante elevados (acima de 600  $\mu\text{mol/L}$ ) apresentaram maior índice de dano do que aqueles pacientes com um “adequado” controle da Phe (abaixo de 600  $\mu\text{mol/L}$ ), que, por sua vez, já apresentaram dano significativo em relação aos indivíduos normais (SITTA *et al.*, 2009b).

Reforçando os dados encontrados nas células gliais, o dano ao DNA induzido pelo PPA parece ser maior do que o dano induzido pelos demais metabólitos. Foi possível observar que essa diferença pode ter sido causada pelo aumento significativo de células com índice de dano 2, enquanto o PAA e o PLA apresentaram majoritariamente índice de dano 1 (dados não mostrados). Diferentemente do ensaio com células gliais, nos leucócitos foi possível observar que tanto a Phe quanto o conjunto da Phe e seus metabólitos apresentaram perfis de dano ao DNA muito semelhantes entre si, com maior número de células de classe de dano 2 (dados não mostrados).

Cabe salientar que Tuchman *et al.* (1985) determinaram os níveis plasmáticos dos metabólitos PAA, PLA e PPA em 20 pacientes com PKU (com níveis plasmáticos de Phe  $745,1 \pm 472,0 \mu\text{M}$ ) e verificaram que as concentrações médias encontradas foram,  $5,5 \pm 6,0$ ,  $7,2 \pm 10,4$  e  $10,8 \pm 6,1 \mu\text{M}$ , respectivamente. Ainda, foi observado que quando estes pacientes tinham concentrações plasmáticas de Phe

acima de 1000  $\mu\text{M}$  os mesmos apresentaram concentrações plasmáticas médias do PAA e PLA e PPA em torno de 10, 17,5 e 15  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Na PKU, para manter a Phe dentro de níveis considerados adequados, os pacientes são recomendados a seguir uma dieta especial, com baixa ingestão de proteína, que exclui, quase que completamente, produtos de origem animal e permite o consumo de quantidades controladas de cereais, frutas e vegetais. Consiste de uma dieta hipoproteica, suplementada com uma fórmula especial que contém aminoácidos (exceto a Phe) e micronutrientes (SCRIVER *et al.*, 2001; COLOME *et al.*, 2003). A baixa ingestão de proteínas com alto valor biológico diminui, entretanto, a biodisponibilidade de diversos nutrientes, dentre eles, substâncias com ação antioxidante, como o selênio, a LC e a Q10 (SCHULPIS *et al.*, 1990; VAN BAKEL *et al.*, 2000; ARTUCH *et al.*, 2004; SITTA *et al.*, 2011). Estando bem definidas as importantes funções que a LC exerce no organismo, incluindo àquelas de proteção ao dano oxidativo e de antioxidantes em EIM, algumas fórmulas sintéticas utilizadas no tratamento dos pacientes com PKU têm incluído em sua composição a LC (RIBAS *et al.*, 2014). Entretanto, alguns pacientes utilizam fórmulas sintéticas que não contém LC.

Uma vez que a Phe e seus metabólitos causaram danos ao DNA, em leucócitos, testamos o efeito *in vitro* da LC em duas concentrações (30 e 100  $\mu\text{M}$ ) na Phe e seus metabólitos, nas duas faixas de concentração (Phe 600  $\mu\text{M}$  + PAA 5  $\mu\text{M}$  + PLA 10  $\mu\text{M}$  + PPA 10  $\mu\text{M}$  e Phe 1200  $\mu\text{M}$  + PAA 10  $\mu\text{M}$  + PLA 20  $\mu\text{M}$  + PPA 15  $\mu\text{M}$ ), nas mesmas condições e concentrações usadas no ensaio em leucócitos humanos. O co-tratamento com LC 30  $\mu\text{M}$  resultou em diminuição do DI ao DNA apenas na faixa de concentração mais baixa. Já o co-tratamento com LC 100  $\mu\text{M}$  resultou em diminuição do DI em ambas as faixas de concentração, mas não a nível de controle. Nossos resultados estão de acordo com Deon *et al.* (2015a) onde a LC em concentrações de 15, 30, 120 e 150  $\mu\text{M}$  foi capaz de reduzir o dano ao DNA induzido pela Phe 1000 e 2500  $\mu\text{M}$  em leucócitos humanos. Ainda, Ribas e colaboradores (2011), em estudo *in vitro*, observaram que LC na concentração de 60  $\mu\text{M}$  foi capaz de reduzir o dano ao DNA induzido por ácidos orgânicos (ácidos propiônico e metilmalônico).

Embora o ensaio cometa não seja uma técnica que determine apenas dano oxidativo ao DNA, existem estudos indicando a ocorrência de processos oxidativos a outras biomoléculas na PKU, como proteínas e lipídeos (DEON *et al.*, 2015b; SITTA



*et al.*, 2009; ROCHA e MARTINS, 2012; SIMON *et al.*, 2013), e, portanto, poderíamos inferir que as quebras ao DNA produzidas na doença seriam geradas por espécies reativas. Ainda, Shulpis *et al.* (2005) observaram um aumento de 8-OHdG, que reflete o dano oxidativo ao DNA, no plasma de pacientes fenilcetonúricos com dieta mal controlada. Deon *et al.* (2015b) verificaram que os níveis urinários de 8-OHdG em pacientes com PKU correlacionaram-se positivamente com o nível sanguíneo de Phe (519 a 779  $\mu\text{mol/L}$ ) e negativamente com a concentração de LC livre no sangue (28 a 44  $\mu\text{mol/L}$ ).

Neste trabalho, a geração de espécies reativas foi medida pelo ensaio de oxidação da DCF (diclorofluoresceína) em células gliais, nas mesmas concentrações usadas no ensaio cometa. Os níveis de DCF estavam significativamente aumentados nas células gliais tratadas com Phe, PAA, PLA, PPA separadas e em conjunto, em comparação com as células gliais não tratadas. Observamos que a maior produção de espécies reativas ocorreu na concentração de Phe 300  $\mu\text{M}$ . O pré-tratamento com LC 60  $\mu\text{M}$  quando adicionado às células gliais, foi capaz de reduzir a geração de espécies reativas induzidas pela Phe, PAA, PLA (somente na concentração de 3  $\mu\text{M}$ ) e no conjunto da Phe e seus metabólitos.

LC não reduziu as espécies reativas produzidas pelo PPA. Uma vez que já foi verificado que a LC possui propriedade de sequestrar radicais livres e quelar íons metálicos que participam das reações de iniciação e propagação do EO (GULÇIN, 2006), é plausível propor que a LC possa inibir a oxidação do DCF que é desencadeada por espécies reativas. O ensaio da oxidação da DCF estima a geração intracelular de espécies reativas, sendo suscetível à oxidação por um grande número de ERO diferentes. Esta falta de especificidade faz com que este composto avalie o ambiente oxidativo celular, independentemente de quais radicais ou combinação de ERO são responsáveis pela condição celular. (OYAMA *et al.*, 1994).

Diferentes mecanismos pelos quais a Phe pode induzir seus efeitos deletérios no cérebro incluem comprometimento da captação de LNAA no cérebro, redução da disponibilidade para síntese de neurotransmissores, inibição de atividades enzimáticas chave, redução da atividade da monoamina oxidase B como gene modificador, alteração no metabolismo da mielina e EO, devido ao acúmulo de metabólitos tóxicos que podem levar à produção de RL e/ou à diminuição das defesas antioxidantes, causando danos nas macromoléculas celulares essenciais,

como proteínas, lipídios e DNA (Ghozlan *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 2007; HALLIWEL E GUTTERIDGE, 2007; BLAU *et al.*, 2010). Esse é o primeiro estudo na literatura que avaliou o dano ao DNA bem como o efeito antioxidante da LC em células gliais C6. Nossos resultados mostram pela primeira vez na literatura, que a Phe e os seus metabólitos, PAA, PLA e PPA, induzem dano ao DNA *in vitro* em células gliais C6 e leucócitos humanos, bem como aumento da produção de ERO, e que este dano parece ter origem oxidativa. Avaliando os resultados encontrados, podemos inferir que a Phe e o PPA parecem ser os principais responsáveis pelos danos gerados. Embora os mecanismos subjacentes ao aumento do dano oxidativo na PKU não sejam completamente compreendidos, sugere-se que possa ser devido a um efeito sinérgico do acúmulo dos metabólitos tóxicos.

Além disso, demonstramos que a LC exerceu ação protetora, *in vitro*, reduzindo o dano ao DNA e a geração de espécies reativas. Isso ocorreu possivelmente pelas suas propriedades antioxidantes, visto sua propriedade *scavenger* de radicais livres, indicando um possível papel neuroprotetor para LC na PKU. Considerando que o tratamento preconizado para os pacientes fenilcetonúricos envolve uma dieta restrita em proteínas com deficiência de antioxidantes, entre eles a carnitina, uma suplementação, especialmente com LC, pode ser considerada uma terapia adjuvante adequada para esses pacientes.

## **6. CONCLUSÕES**

---



A partir dos resultados obtidos nessa dissertação de mestrado, foi possível concluir que:

a) No ensaio de citotoxicidade a Phe (150 e 300  $\mu\text{M}$ ), PAA (2 e 4  $\mu\text{M}$ ), PLA (3 e 6  $\mu\text{M}$ ), PPA (2 e 4  $\mu\text{M}$ ) e LC (60  $\mu\text{M}$ ) não prejudicaram o crescimento celular das células gliais tratadas, pois todos os grupos estudados apresentaram uma porcentagem de viabilidade celular alta quando comparada as células gliais nativas;

b) A Phe (150 e 300  $\mu\text{M}$ ) e seus metabólitos PAA (2 e 4  $\mu\text{M}$ ), PLA (3 e 6  $\mu\text{M}$ ) e PPA (2 e 4  $\mu\text{M}$ ) induzem *in vitro* dano ao DNA em cultura de células gliais;

c) O pré-tratamento *in vitro* com LC (60  $\mu\text{M}$ ) foi capaz de reverter, a nível de controle, o dano ao DNA induzido pela Phe e seus metabólitos em cultura de células gliais;

d) A Phe (600 e 1200  $\mu\text{M}$ ) e seus metabólitos PAA (5 e 10  $\mu\text{M}$ ), PLA (10 e 20  $\mu\text{M}$ ) e PPA (10 e 15  $\mu\text{M}$ ) induzem *in vitro* dano ao DNA em leucócitos humanos;

e) O co-tratamento *in vitro* com LC (30  $\mu\text{M}$ ) foi capaz de reverter o dano ao DNA induzido pela Phe e seus metabólitos incubados em conjunto na menor faixa de concentração testada, em leucócitos humanos;

f) O co-tratamento *in vitro* com LC (100  $\mu\text{M}$ ) foi capaz de reverter o dano ao DNA induzido pela Phe e seus metabólitos incubados em conjunto nas duas faixas de concentração testadas, em leucócitos humanos;

g) A incubação *in vitro* de Phe (150 e 300  $\mu\text{M}$ ), PAA (2 e 4  $\mu\text{M}$ ), PLA (3 e 6  $\mu\text{M}$ ), PPA (2 e 4  $\mu\text{M}$ ) aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio em cultura de células gliais;

h) O pré-tratamento com LC (60  $\mu\text{M}$ ) foi capaz de reduzir a geração de espécies reativas de oxigênio induzidas pela Phe (150 e 300  $\mu\text{M}$ ), PAA (2 e 4  $\mu\text{M}$ ), PLA (somente a menor concentração - 3  $\mu\text{M}$ ) e no conjunto da Phe e seus metabólitos em cultura de células gliais. LC (60  $\mu\text{M}$ ) não reduziu as espécies reativas de oxigênio produzidas pelo PPA (2 e 4  $\mu\text{M}$ ) e a maior concentração do PLA (6  $\mu\text{M}$ ).

Dessa maneira, conclui-se que há dano ao DNA e produção de espécies reativas de oxigênio em cultura de células gliais e leucócitos humanos induzido pela Phe e seus metabólitos: PAA, PLA e PPA, o que pode estar relacionado a fisiopatologia da PKU, e que a LC possui capacidade, *in vitro*, para reverter o dano ao DNA e a geração de espécies reativas, conferindo neuroproteção. É importante enfatizar que os resultados apresentados neste trabalho devem ser interpretados com cautela, mas é possível sugerir que a suplementação com LC possa ser usada como um eficiente adjuvante na terapia de pacientes fenilcetonúricos.

## **REFERÊNCIAS**

---





AGARWAL, A.; SAID, T.M. Carnitines and male infertility. **Reprod Biomed Online**. 8(4):376-384. 2004.

ALBRECHT, J.; SVEN F.GARBADE, S.F.; BURGARD, P. Neuropsychological speed tests and blood phenylalanine levels in patients with phenylketonuria: A meta-analysis. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. 33(3):414-421. 2009.

ANDERSON, P.J.; et al. Are neuropsychological impairments in children with early treated phenylketonuria (PKU) related to white matter abnormalities or elevated phenylalanine levels? **Dev Neuropsychol**. 32(2):645-668. 2007.

ARTUCH, R.; et al. A longitudinal study of antioxidant status in phenylketonuric patients. **Clin Biochem**. 37:198-203. 2004.

BARSCHAK, A.G.; et al. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. **Metab Brain Dis**. 21:279-286. 2006.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. Bioquímica. 5ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 2004.

BLAU, N.; VAN SPRONSEN, F.J.; LEVY, H.L. Phenylketonuria. **Lancet**. 376(9750):1417-1427. 2010.

BREMER, J. Carnitine metabolism and functions. *Physiol Rev*. 63:1420-1480. 1983.

BURGARD, P.; et al. Rationale for the German recommendations for phenylalanine level control in phenylketonuria. **Eur J Pediatr**. 158:46-54. 1999.

CAMPISTOL, J. Hiperfenilalaninemia. In: SANJURJO, P. AND BALDELLOU, A.

CARVALHO, T.M. Resultados do levantamento epidemiológico da sociedade brasileira de triagem neonatal (SBTN). **Rev Méd Minas Gerais**. 13(1 Supl 2):S109-135. 2003.

CENTERWALL, S.A.; CENTERWALL, W.R. The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two retard children, and a scientist. **Pediatrics**, 105, 89-103. 2000.

CHILDS, B.; VALLE, D.; JIMENEZ-SANCHEZ, G. The Inborn Error and Biochemical Individuality. In: SCRIVER, C.R.; SLY, W.A.; BEAUDET, A.L.; VALLE, D., **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, 8ª edição. (eds). New York, McGraw-Hill Inc. 2001.

CLAGUE, A.; THOMAS, A. Neonatal biochemical screening for disease. **Clin Chim Acta**. 315:99-110. 2002.

COLLINS, A.R. Measuring oxidative stress to DNA and its repair with comet assay. **Biochim Biophys Acta**. 1840:794-800. 2014.

COLOMÉ, C.; et al. Lipophilic antioxidants in patients with phenylketonuria. **Am J Clin Nutr**. 77:185-188. 2003.

COOKE, M.S.; et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **FASEB J** 17:1195-1214. 2003.

COOPER, G. The Cell: a molecular approach. 2ª edição. (ed). Sunderland: Sinauer Associates. 2000.

COOSTABEBER, E.; et al; Hyperphenylalaninemia reduces creatine kinase activity in the cerebral cortex of rats. **Int J Dev Neurosci**. 21(2):111-6. 2003.

DE GROOT, M.J.; et al. Phenylketonuria: brain phenylalanine concentrations relate inversely to cerebral protein synthesis. **J Cereb Blood Flow Metab**. 35(2):200-205. 2015.

DE MIRA, N.V.M; MÁRQUEZ, U.M.L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. **Rev Saúde Pública**. 34(1):86-96. 2000.

DE GROOT, M.J.; et al. Pathogenesis of cognitive dysfunction in phenylketonuria: review of hypotheses. **Mol Genet Metab**. 99 Suppl 1:S86-9. 2010.

DEON, M.; et al. Protective effect of L-carnitine on Phenylalanine-induced DNA damage. **Metab Brain Dis**. 30:925-933. 2015a.

DEON, M.; et al. Urinary biomarkers of oxidative stress and plasmatic inflammatory profile in phenylketonuric treated patients. **Int J Dev Neurosci**. 47:259–265. 2015b.

DERIN, A.; et al. The effects of L-carnitine on presbycusis in the rat model. **Clin Otolaryngol Allied Sci**. 29(3):238-41. 2004.

Diagnostico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditárias. 2ª edição. (Eds). Madrid:Ergon. 2006.

DILELLA, A. G.; ET AL. Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. **Biochemistry**. 25:743-749. 1986.

DONIDA, B.; et al. Oxidative profile exhibited by Mucopolysaccharidosis type IVA patients at diagnosis: Increased keratan urinary levels. **Mol Genet Metab Rep**. 25;11:46-53. 2017.

ERCAL, N; et al. Oxidative stress in a phenylketonuria animal model. **Free Radic BiolMed**. 32:906-911. 2002.

FEKSA, L.R.; et al. Alanine prevents the reduction of pyruvate kinase activity in brain cortex of rats subjected to chemically induced hyperphenylalaninemia. **Neurochem Res**. 27(9):947-52. 2002.

FERNANDES, C.G.; et al. Experimental evidence that phenylalanine provokes oxidative stress in hippocampus and cerebral cortex of developing rats. **Cell Mol Neurobiol**. 30:317–326. 2010.

GASSIÓ R., et al. Cognitive Functions and the Antioxidant System in Phenylketonuric Patients. **Neuropsych**. 22(4): 426– 431. 2008.

GHOZLAN, A.; VAROQUAUX, O.; ABADIE, V. Is monoamine oxydase-B a modifying gene and phenylethylamine a harmful compound in phenylketonuria? **Mol Genet Metab.** 83(4):337–34. 2004.

GRAZIT, V.; et al. beta-Phenylpyruvate induces long-term neurobehavioral damage and brain necrosis in neonatal mice. **Behav Brain Res.** 143(1):1-5. 2003.

GREVE, L.C.; et al. Breast-feeding in the management of the newborn with phenylketonuria: a practical approach to dietary therapy. **J Am Diet Assoc.** 94(3):305-309. 1994.

GUERREIRO, G.; et al. Oxidative damage in glutaric aciduria type I patients and the protective effects of L-carnitine treatment. **J Cell Biochem.** 119(12):10021-10032. 2018.

GÜLÇİN, I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. **Life Sci** 78:803–811. 2006.

GULDBERG, P.; et al. Phenylketonuria in a low incidence population: molecular characterisation of mutations in Finland. **J Med Genet.** 32(12):976-978. 1995.

HALLIWELL B. Reactive species and antioxidants redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol.** 141: 312–322. 2006.

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

HALLIWELL, B. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. **Biochem Soc Trans.** 24:1023-1027. 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. In: Halliwell B, Gutteridge JMC (eds) **Free radicals in biology and medicine.** Oxford University Press, Oxford, pp 246-350. 2007.

HOEKSMAN, M.; et al. Phenylketonuria: High plasma phenylalanine decreases cerebral protein synthesis. **Mol Genet Metab.** 96(4):177-82. 2009.

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

HOFMAN, K.J.; et al. Phenylketonuria in U.S. blacks: molecular analysis of the phenylalanine hydroxylase gene. **Am. J. Hum. Genet.,** 48:791-798. 1991.

JACKSON, S.P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease, **Nature.** 461:1071–1078. 2009.

JESSEN, K.R. Glial cells. **Int J Biochem Cell Biol.** 36:1861-1867. 2004.

KAUFMAN, S. An evaluation of the possible neurotoxicity of metabolites of phenylalanine. **J Pediatr.** 114(5):895-900. 1989.

- KIENZLE HAGEN, M.E.; et al. Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1586, 344–352. 2002.
- KIMURA, T.; et al. Mutation analysis of phenylketonuria in Yamagata prefecture, Japan. **Pediatr Int**. 43(1):1-3. 2001.
- KOHLI, S.; et al. Prenatal diagnosis of phenylketonuria. **Indian. J Med Res**. 122:400-403. 2005.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M. M. Principles of Biochemistry. New York, Freeman and Company, 5<sup>a</sup> edição. 2008.
- LEVY, H.L. Phenylketonuria: old disease, new approach to treatment. **Proc Natl Acad Sci USA**, 96(5):1811-3. 1999.
- LIAO, W.; MCNUTT, M.A.; ZHU, W.G. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**. 48:46-53. 2009.
- LIN, Y.C.; TSAI, P.F.; WU, J.S. Protective effect of anthocyanidins against sodium dithionite-induced hypoxia injury in C6 glial cells. **J Agric Food Chem**. 62(24):5603-5608. 2014.
- LYON, M.G.; ADAMS, R.D.; KOLODNY, E.H. Neurology of hereditary metabolic diseases of children. 2<sup>a</sup> edição. New York, McGraw-Hill. 1996.
- MARCHETTI, D.P.; et al. Protective effect of antioxidants on DNA damage in leukocytes from X-linked adrenoleukodystrophy patients. **Int J Dev Neurosci**. 43:8-15. 2015.
- MARTINEZ-CRUZ, F.; et al. Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: prevent by melatonin, vitamin E and vitamin C. **J Neurosci Res**. 69:550-558. 2002.
- MARTINS, F.F.; et al. Metabolismo do cálcio na Fenilcetonúria. **Rev Nutr**. 22(3):419-428. 2009.
- MATALON, R.; et al. Large neutral amino acids in the treatment of phenylketonuria (PKU). **J. Inherit. Metab. Dis**. 29(6):732-738. 2006.
- MATÉS, J.M.; PEREZ-GÓMEZ, C.; CASTRO, I.N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin Biochem**. 32(8):5595-5603. 1999.
- MAXWELL, S.R. Prospects for the use of antioxidant therapies. **Drugs**. 49: 345-361. 1995.
- MESCKA, C.; et al. Protein and lipid damage in maple syrup urine disease patients: L-carnitine effect. **Int J Dev Neurosci**. 31:21-24. 2013.
- MESCKA, C.P.; et al. Investigation of inflammatory profile in MSUD patients: benefit of L-carnitine supplementation. **Metab Brain Disease**. 30:1167-1174. 2015.

MESCKA, C.P.; et al. L-carnitine prevents oxidative stress in the brains of rats subjected to a chemically induced chronic model of MSUD. **Mol Neurobiol.** 53(9):6007-6017. 2016.

MESCKA, C.P.; et al. Prevention of DNA damage by L-carnitine induced by metabolites accumulated in maple syrup urine disease in human peripheral leukocytes in vitro. **Gene.** 548:294-298. 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Normas Técnicas e Rotinas Operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal. Secretaria de Assistência à Saúde, Coordenação Geral de Atenção Especializada. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Pacientes receberão medicação para doença rara fenilcetonúria. <https://goo.gl/58ou9d>. Acessado em 23 de janeiro de 2019.

MORAES, T.B.; et al. Lipoic acid prevents oxidative stress in vitro and in vivo by an acute hyperphenylalaninemia chemically-induced in rat brain. **Journal of the neurological sciences.** 292, 89–95. 2010.

MORAES, T.B.; et al. Role of catalase and superoxide dismutase activities on oxidative stress in the brain of a phenylketonuria animal model and the effect of lipoic acid. **Cellular and molecular neurobiology.** 33, 253–60. 2013.

MORETTI, S.; et al. L-carnitine reduces lymphocyte apoptosis and oxidant stress in HIV-1-infected subjects treated with zidovudine and didanosine. **Antioxid Redox Signal.** 4(3):391-403. 2002.

MOYLE, J.J.; et al. Meta-Analysis of Neuropsychological Symptoms of Adolescents and Adults with PKU. **Neuropsychol. Rev.** 17:91-101. 2007.

MUTHUSWAMY, A.D.; et al. Oxidative stress-mediated macromolecular damage and dwindle in antioxidant status in aged rat brain regions: role of L-carnitine and DL-alpha-lipoic acid. **Clin Chim Acta.** 368(1-2):84-92. 2006.

OYAMA, Y.; et al. Characterization of 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence in dissociated mammalian brain neurons: estimation on intracellular content of hydrogen peroxide. **Brain Res.** 635(1-2):113-7. 1994.

OZALP, I. Newborn PKU screening in Turkey: at present and organization for future. **Turk J Pediatr.** 43(2):97-101. 2001.

PIEETA, P.G.; et al. Flavonoids as antioxidants. **J Nat Prod.** 63:1035-1042. 2000.

POLLITT, R.J. International perspectives on newborn screening. **J Inherit Metab Dis.** (2-3):390-6. 2006.

POSER, C.M.; VAN BOGAERT, L. Neuro-pathologic observations in phenylketonuria. **Brain.** 82(1):1-9. 1959.

PRZYREMBEL, H.; BREMER, H.J. Nutrition, physical growth, and bone density in treated phenylketonuria. **Eur J Pediatr** 159 (Suppl 2):S129-S135. 2000.

RECH, V.C.; et al. Inhibition of the mitochondrial respiratory chain by phenylalanine in rat cerebral cortex. **Neurochem Res.** 27(5):353-7. 2002.

REZNICK, A.Z.; PACKER, L. Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. In: POLI, G.; ALBANO, E.; DIANZANI, M.U. **Free radicals: from Basic Science to Medicine.** (eds) Birkhauser, Basel. pp 425-437. 1993.

RIBAS, G.S.; et al. Oxidative stress in phenylketonuria: what is the evidence?. **Cell Mol Neurobiol.** 31(5):653-62. 2011.

RIBAS, G.S.; et al. Prevention by L-carnitine of DNA damage induced by propionic and L-methylmalonic acids in human peripheral leukocytes in vitro. **Mut Res.** 702:123-128. 2010b.

RIBAS, G.S.; et al. Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation. **Int J Dev Neurosci.** 28:127-132. 2010a.

RIBAS, G.S.; VARGAS, C.R.; WAJNER, M. L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders. **Gene.** 533:469-476. 2014.

ROCHA, J.C.; MARTINS, M.J. Oxidative stress in phenylketonuria: future directions. **J Inherit Metab Dis.** 35(3):381-398. 2012.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J.A.P. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. 1ª edição. Canoas: Editora Ulbra. P.13-110. 2004.

SANTOS, L.L.; et al. The time has come: a new scene for PKU treatment. **Genet Mol Res.** 5:33-44. 2006.

SARKISSIAN, C.N.; et al. What we know that could influence future treatment of phenylketonuria. **J. Inherit. Metab. Dis.** 32(1):3-9. 2009.

SARKISSIAN, C.N.; GÁMEZ, A. Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria, where are we now?. **Mol Genet Metab.** 86 Suppl 1:S22-6. 2005.

SARKISSIAN, C.N.; SCRIVER, C.R.; MAMER, A.O. Measurement of phenyllactate, phenylacetate, and phenylpyruvate by negative ion chemical ionization-gas chromatography/mass spectrometry in brain of mouse genetic models of phenylketonuria and non-phenylketonuria hyperphenylalaninemia. **Anal Biochem.** 280(2):242-9. 2000.

SAUDUBRAY, J.M.; CHARPENTIER, C. Clinical Phenotypes: Diagnosis/Algorithms. In: SCRIVER, C.R.; SLY, W.A.; BEAUDET, A.L.; VALLE, D., **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, 8ª edição. (eds). New York, McGraw-Hill Inc. 1327-1403. 2001.

SCHOEMANS, R.; et al. Oligodendrocyte development and myelinogenesis are not impaired by high concentrations of phenylalanine or its metabolites. **J Inherit Metab Dis.** 33(2):113-120. 2010.

SCHULPIS, K.H.; et al. Low total antioxidant status in implicated with high 8-hydroxy-2-deoxyguanosine serum concentrations in phenylketonuria. **Clin Biochem.** 38(3):239-242. 2005.

SCHULPIS, K.H.; et al. Serum carnitine level in phenylketonuric children under dietary control in Greece. **Acta Pediatric Scand.** 79:930-934. 1990.

SCHULPIS, K.H.; KARIYANNIS, C.; PAPASSOTIRIOU, I. Serum levels of neural protein S-100B in phenylketonuria. **Clin Biochem.** 37:76-79. 2004.

SCRIVER, C. R. Commentary on: A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants, by Robert Guthrie and Ada Susi. **Pediatrics.** 236-237. 1998.

SCRIVER, C.R., et al. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, 8<sup>a</sup> edição. New York, McGraw-Hill Inc. 2001.

SCRIVER, C.R.; et al. Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. In: Scriver, C.R.; et al. (Eds. Emeritus). **The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease**. Chapter. 77:8. 2008.

SCRIVER, C.R.; KAUFMAN, S. Hyperphenylalaninemias: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: SCRIVER, C.R.; SLY, W.A.; BEAUDET, A.L.; VALLE, D., **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, 8<sup>a</sup> edição. (eds). New York, McGraw-Hill Inc. 2001.

SHAH, D.W.W.; WEINBERGER, E.D.; MARAVILLA, K.R. Cranial MR in phenylketonuria. **J Comp Ass Tomogr.** 14,458-460. 1990.

SIERRA, C.; et al. Antioxidant status in hyperphenylalaninemia. **Clin Chim Acta.** 276(1):1-9. 1998.

SIMON, K.R.; et al; DNA damage induced by phenylalanine and its analogue p-chlorophenylalanine in blood and brain of rats subjected to a model of hyperphenylalaninemia. **Biochem Cell Biol.** 91(5):319-324. 2013.

SINGH, N.P.; et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res.** 175(1):184-191. 1988.

SIRTORI, L.R.; et al. Oxidative stress in patients with phenylketonuria. **Biochim Biophys Acta.** 1740:68-73. 2005.

SITTA, A.; et al. Effect of short- and long-term exposition to high phenylalanine blood levels on oxidative damage in phenylketonuric patients. **Int J Dev Neurosci.** 27:243–247. 2009a.

SITTA, A.; et al. Evidence that DNA damage is associated to phenylalanine blood levels in leukocytes from phenylketonuric patients. **Mutat Res.** 679:13-16. 2009b.

SITTA, A.; et al. Evidence that L-carnitine and selenium supplementation reduces oxidative stress in phenylketonuric patients. **Cell Mol Neurobiol.** 31(3):429–436. 2011.

SITTA, A.; et al. Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. **Metab Brain Dis.** 21:287-296. 2006.

SITTA, A.; et al. L-carnitine blood levels and oxidative stress in treated phenylketonuric patients. **Cell Mol Neurobiol.** 29:211-218. 2009c.

SLAMON, N.D.; PENTREATH, V.W. Antioxidant defense against antidepressants in C6 and 1321N1 cells. **Chem Biol Interact.** 127(3):181-99. 2000.

SOLARSKA, K.; et al. The antioxidant properties of carnitine in vitro. **Cell Mol Biol Lett.** 15:90-97. 2010.

TAM, S.Y.; ROTH, R.H. Mesoprefrontal dopaminergic neurons: can tyrosine availability influence their functions ?. **Biochem. Pharmacol.** 53:441-453. 1997.

TICE, R.R.; STRAUSS, G.H. The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. **Stem Cells.** 13 Suppl 1:207-214. 1995.

TING, W.; et al. L-carnitine prevents ammonia-induced cytotoxicity and disturbances in intracellular amino acid levels in human astrocytes. **J Gastroenterol Hepatol.** 2018. doi: 10.1111/jgh.14497.

TREFZ, F.; et al. Adult phenylketonuria outcome and management. **Mol Genet Metab.** 104:S26-S30. 2011.

TREFZ, F.K.; et al. Long-term treatment of patients with mild and classical phenylketonuria by tetrahydrobiopterin. **Mol Genet Metab.** 86 Suppl 1:S75-80. 2005.

TUCHMAN, M. et al. Acidic metabolites of phenylalanine in plasma of phenylketonurics. **Biochemical Medicine.** 34(2):203-206. 1985.

VAN BAKEL, M.M.E; et al. Antioxidant and thyroid hormone status in selenium-deficient phenylketonuric and hyperphenylalaninemic patients. **Am J Clin Nutr.** 72:976-981. 2000.

VAN SPRONSEN, F.J.; et al. Large daily fluctuations in plasma tyrosine in treated patients with phenylketonuria. **Am J Clin Nutr.** 64(6):916-21. 1996.

VAN SPRONSEN, F.J.; SMIT, P.G.; KOCH, R. Phenylketonuria: tyrosine beyond the phenylalanine-restricted diet. **J Inherit Metab Dis** 24:1-4. 2001.

VARGAS, C.R.; et al. Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. **Biochim Biophys Acta.** 1688:26-32. 2004.

VARGAS, C.R.; WAJNER, M.; SITTA, A. Oxidative stress in phenylketonuric patients. **Mol Genet Metab.** 104 Suppl:S97-9. 2011.

VIDAK, M.; ROZMAN, D.; KOMEL, R. Effects of Flavonoids from Food and Dietary Supplements on Glial and Glioblastoma Multiforme Cells. **Molecules.** 20(10):19406-19432. 2015.



WAJNER, M.; et al. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. **J Inherit Metab Dis**. 27(4):427-48. 2004.

WAPPNER, R.; et al. Management of phenylketonuria for optimal outcome: a review of guidelines for phenylketonuria management and a report of surveys of parents, patients, and clinic directors. **Pediatrics**. 104:e68. 1999.

WEGLAGE, J.; et al. Neurocognitive functioning in adults with phenylketonuria: results of a long term study. **Mol Genet Metab**. 110 Suppl:S44-8. 2013.

WILKE, B.C.; et al. Selenium, glutathione peroxidase (GSH-Px) and lipid peroxidation products before and after selenium supplementation. **Clin Chim Acta**. 207, 137-142. 1992.

WILLIAMS, R.A.; MAMOTTE, C.D.S.; BURNETT, J.R. Phenylketonuria: An inborn error of phenylalanine metabolism. **Clin Biochem**. Rev 29: 31-41. 2008.

WOO, S.L.C.; et al. Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. **Nature**. 306:151-155. 1983.

WYSE, A.T.; et al. Alanine reverses the inhibitory effect of phenylalanine and its metabolites on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of rats. **Biochem Soc Trans**. 23(2):227S. 1995.

ZABLOCKA, A.; JANUSZ, M. The two faces of reactive oxygen species. **Postepy Hig Med Dosw**. 62:118-24. 2008.

ZHANG, Y.; GU, X.; YUAN, X. Phenylalanine activates the mitochondria-mediated apoptosis through the RhoA/Rho-associated kinase pathway in cortical neurons. **Eur J Neurosci**. 25(5):1341-1348. 2007.

ZSCHOCKE, J.; et al. Phenylketonuria and the people of Northern Ireland. **Hum Genet**. 100(2):189-194. 1997



**ANEXOS**

---



**ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:  
INDIVÍDUOS CONTROLE**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
(Grupo Controle)**

**Título do Projeto:** Efeito antioxidante da L-carnitina sobre o acúmulo de fenilalanina e seus metabólitos ácido fenilacético, ácido fenilático e ácido fenilpirúvico em células gliais

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é investigar uma doença genética chamada de Fenilcetonúria (PKU), que tem por objetivo verificar o efeito *in vitro* da fenilalanina e dos principais metabólitos acumulados na doença sobre o estresse oxidativo, ou seja, da ação dos radicais livres (moléculas encontradas normalmente em nosso organismo que quando em excesso podem ser nocivas), e o efeito da substância antioxidante, L-carnitina, sobre o dano ao DNA (pacientes PKU possuem deficiência desse antioxidante, que pode ser capaz de diminuir a atuação dos radicais livres). Você está sendo convidado a participar como grupo controle, ou seja, porque não possui o diagnóstico da condição em estudo, a Fenilcetonúria. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Genética Médica (SGM) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: serão perguntados alguns dados como nome, idade, uso de medicação, se você é fumante e se possui doença prévia. Será coletada amostra de sangue periférico. Será necessário coletar 5 mL de sangue (equivalente a 1 colher de chá).

Os riscos envolvidos na sua participação são relativos à coleta de sangue, que será realizada por profissional treinado e habilitado. Poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Se houver vazamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. Após o término do estudo os materiais biológicos que ainda estiverem armazenados poderão ser descartados ou mantidos para futuras pesquisas dentro do mesmo objetivo deste estudo, de acordo com a

sua decisão de autorizar o uso futuro. Se autorizado, o material somente será utilizado para novas pesquisas mediante seu consentimento por escrito.

Com relação ao uso do material biológico, ao final do estudo, você (marque com um X):

( ) autoriza o armazenamento.

( ) não autoriza o armazenamento, solicitando que seja descartado.

A participação na pesquisa não trará benefícios diretos aos participantes, porém, contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado, e poderá beneficiar futuros pacientes.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Profa. Dra. Carmen Regla Vargas ou com a Pesquisadora Jéssica Lamberty Faverzani pelo telefone (51) 3359.8011, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

\_\_\_\_\_  
Nome do participante da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador que aplicou o Termo

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Local e Data: \_\_\_\_\_





## ANEXO B - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

Carta de Aprovação

**Projeto**

2018/0527

**Pesquisadores:**

CARMEN REGLA VARGAS

MOACIR WAJNER

MARION DEON

JESSICA LAMBERTY FAVERZANI

DANIELLA DE MOURA COELHO

**Número de Participantes:** 0

**Título:** Efeito antioxidante da L-carnitina sobre o acúmulo de fenilalanina e seus metabólitos ácido fenilacético, ácido fenilático e ácido fenilpirúvico em células gliais

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG).



Assinado digitalmente por:  
PATRICIA ASHTON PROLLA  
Grupo de Pesquisa e Pós-graduação  
06/11/2018 13:38:25

Assinatura digitalizada por: https://www.pff.com.br/assinatura-digitalizada/assinatura-digitalizada.html?sig=664642127