

Carlos Eduardo Diaz Jacques ^a, Fernanda Gobbi de Bitencourt ^a, Júlia Bernadete Silva ^a, Priscila Nicolao Mazzola ^b, Tarsila Barros Moraes ^b, Ângela de Mattos Dutra ^c e Carlos Severo Dutra-Filho ^{a b}

^a Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo – Departamento de Bioquímica – ICBS – UFRGS

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica – UFRGS

^c Departamento de Ciências Básicas da Saúde – UFSCPA

Introdução

A fenilcetonúria (PKU) é um erro inato do metabolismo da fenilalanina (Phe), caracterizada pela deficiência da fenilalanina hidroxilase. Com esta deficiência, ocorre o acúmulo de Phe nos tecidos e fluidos biológicos e, com isso, o organismo encontra vias alternativas para o catabolismo da Phe, gerando os ácidos fenilacético (PA), fenilático (PL) e fenilpirúvico (PP). Não havendo um diagnóstico precoce - preferencialmente na fase neonatal, através do Teste do Pezinho – pode haver, um grave comprometimento neurológico, que, na maioria das vezes, é irreversível. Dentre os sintomas da PKU, os mais pronunciados são retardo mental, ataxia, convulsões e déficit cognitivo. Uma vez que a sintomatologia neuropsicomotora destes pacientes não tem um mecanismo completamente elucidado, e que o estresse oxidativo encontra-se intimamente relacionado a diversas outras patologias metabólicas, supõe-se que este desequilíbrio na homeostase possa ser responsável pelas deficiências cognitivas e neurológicas de pacientes com PKU. Estudos recentes em nosso grupo demonstraram que a administração intracerebroventricular (icv) de Phe, PL e PP alteram inúmeros parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos, como aumento de lipoperoxidação e a alteração na atividade de enzimas antioxidantes.

Objetivo: Avaliar a influência do PA administrado intracerebroventricularmente sobre parâmetros de estresse oxidativo de córtex cerebral de ratos.

Metodologia

Animais e delineamento experimental

Ratos Wistar de 30 dias (n=4-9) foram dispostos em um estereotáxico, aonde procedeu-se a administração icv sob anestesia. Após 15 minutos, os animais foram sacrificados, seus córtex cerebrais removidos, limpos, homogeneizados, e, após centrifugação, o sobrenadante e o *pellet* obtidos foram utilizados para a determinação dos parâmetros a serem avaliados.

As animais foram divididos em dois grupos:

Controle: 5 µL de fluido cérebro-espinhal artificial (ACSF)
Fenilacetato: 0,1 µmol de PA em 5 µL de ACSF

Parâmetros de estresse oxidativo avaliados

Atividade da Glicose-6-fosfato Desidrogenase (G6PD):¹

Baseado no acompanhamento espectrofotométrico a 340 nm da produção de NADPH pela enzima.

Atividade da Catalase (CAT):²

Técnica que detecta o consumo de H₂O₂ – molécula que absorve em 240 nm – pela enzima

Conteúdo de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS):³

Produtos da peroxidação lipídica reagem com o ácido 2-tiobarbitúrico, formando um composto de coloração rosa, que é lido espectrofotometricamente a 532 nm

Conteúdo de Glutathiona Reduzida (GSH):⁴

Método que detecta a 350 nm_{ex} e 420 nm_{em} o fluorocromo o-ftalaldeído após a sua complexação à glutathiona.

Conteúdo de DNA ligado a proteínas (DNA-PC):⁵

O complexo lauril sulfato de sódio/K⁺ precipita as proteínas ligadas covalentemente ao DNA; este por sua vez, é corado pelo Sybr Gold, que permite a determinação fluorimétrica a 485 nm_{ex} e 535 nm_{em}

Oxidação do Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF):⁶

Esterases celulares hidrolisam o diacetato de DCFH; o produto desta hidrólise – DCFH – pode ser oxidado por espécies reativas até DCF, que é detectado fluorimetricamente a 488 nm_{ex} e 525 nm_{em}.

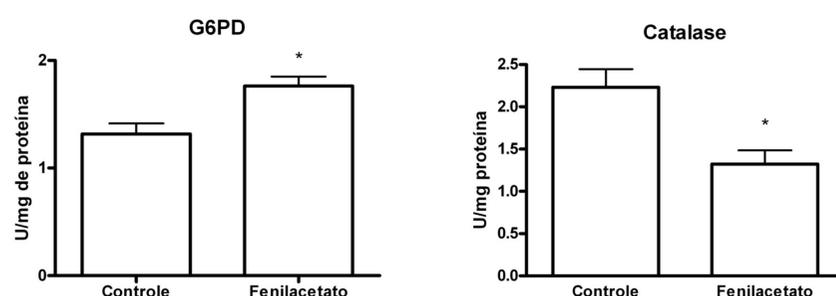
Conclusões

De um modo geral, observa-se que o PA afeta parâmetros *redox* celulares. Ele é capaz de aumentar a lipoperoxidação e o conteúdo de espécies reativas, assim como diminuir a atividade da catalase e o conteúdo de GSH. Verificou-se, ainda, um aumento na atividade da G6PD. Não houve alteração quanto ao conteúdo de DNA-PC em relação ao controle.

Com estes resultados, pode-se inferir que o PA – juntamente com a Phe e os outros metabólitos da mesma – pode ser responsável pelo estresse oxidativo observado em condições de hiperfenilalaninemia.

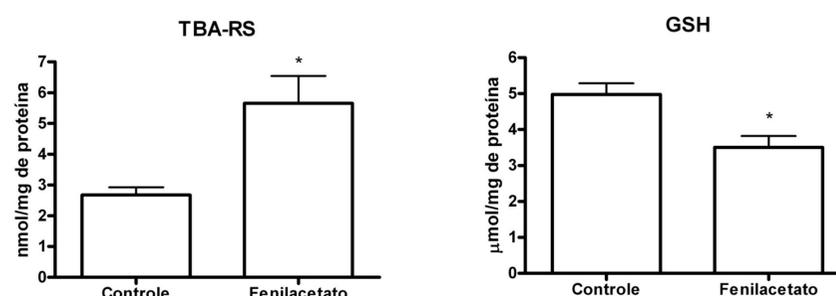
Resultados

Atividade da G6PD e da CAT



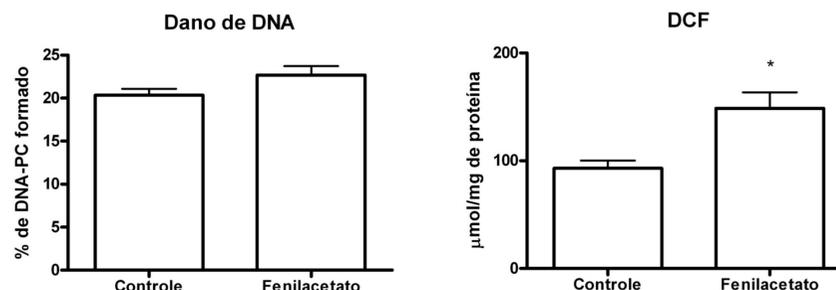
Figuras 01 e 02: Efeito do PA sobre as atividades da G6PD e da CAT. Os resultados são expressos em média ± DP (n = 4-9), * p <0,05 em comparação ao controle (teste t-Student).

Lipoperoxidação e defesas não-enzimáticas



Figuras 03 e 04: Efeito do PA sobre o conteúdo de TBA-RS e de GSH. Os resultados são expressos em média ± DP (n = 4-9), * p <0,05 em comparação ao controle (teste t-Student).

Dano ao DNA e Produção de Espécies Reativas



Figuras 05 e 06: Efeito do PA sobre o conteúdo de DNA-PC e de DCF formado. Os resultados são expressos em média ± DP (n = 4-9), * p <0,05 em comparação ao controle (teste t-Student).

Referências

- 1 Leong SF et al. Biochem J (1984)
- 2 Aebi H. Methods Enzymol (1984)
- 3 Ohkawa H et al. Anal Biochem (1979)
- 4 Browne RW et al. Methods Enzymol (1998)
- 5 Zhitkovich A e Costa M. Carcinogenesis (1992)
- 6 Lebel CP et al. Chem Res Toxicol (1992)