

Carolina Araujo Cirne¹, Carmen Regla Vargas^{2,3}

¹Faculdade de Farmácia, UFRGS; ²Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, UFRGS; ³Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS.

Introdução

A fenilcetonúria (do inglês, "Phenylketonuria" - PKU) é um erro inato do metabolismo da fenilalanina (FAL), bioquimicamente caracterizado pelo acúmulo da FAL e de seus metabólitos nos tecidos e nos líquidos biológicos dos pacientes afetados. O tratamento para a doença consiste em uma dieta restrita em proteínas, suplementada com uma mistura que contém aminoácidos essenciais e micronutrientes.

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes, podendo levar a danos celulares. Em estudos anteriores, foi demonstrado em pacientes PKU evidências de dano oxidativo a lipídeos e proteínas.

Objetivo

Investigar o efeito in vivo e in vitro da FAL sobre o dano ao DNA, medido através do ensaio cometa.

Materiais e Métodos

Estudos in vitro

Amostras de sangue venoso total de um indivíduo saudável em triplicata foram pré-tratados com diferentes concentrações de FAL (100, 250, 500, 1000 e 2500 µmol/L). Estas concentrações de FAL são semelhantes às encontradas no sangue de pacientes com PKU que podem variar de 100 µmol/L em pacientes tratados a mais de 2500 µmol/L no momento do diagnóstico.

Estudos in vivo

Foram avaliados 18 pacientes com PKU clássica submetidos ao tratamento de restrição proteica e suplementação com uma mistura de aminoácidos enriquecida com vitaminas e minerais. Esses pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com sua média anual de níveis sanguíneos FAL. O grupo controle consistiu de 17 indivíduos saudáveis.

Grupo	n	Adesão ao tratamento	Níveis de FAL
1	8	boa	396,4 ± 151.6 µmol/L
2	10	ruim	848,8 ± 150.8 µmol/L

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil. Todos os pais dos pacientes incluídos no presente estudo assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

Metodologia:

Determinação dos níveis sanguíneos de FAL: Medidos espectrofluorimetricamente, com base no método de McCaman e Robins (1962).

Ensaio cometa: Realizado conforme descrito por Singh et al (1988), com algumas modificações.

Resultados

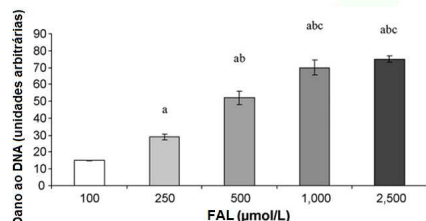


Fig. 1. Efeito in vitro da fenilalanina sobre o dano ao DNA (ensaio cometa) em leucócitos do sangue total. Dados representam média ± D.P. de 3 experimentos independentes (indivíduos). (a) p <0,01 comparado ao grupo com 100 µmol/L de FAL; (b) p <0,01 comparado ao grupo com 250 µmol/L; (c) p <0,01 em comparação com o grupo com 500 µmol/L de FAL (Kruskal-Wallis seguido pelo teste U de Mann-Whitney).

Tabela 2

Idade e valores individuais de DI e de número de células encontradas em cada classe de dano no grupo controle.

Indivíduo controle	idade (anos)	DI	Classe de dano				
			0	1	2	3	4
1	15	13	90	7	3	0	0
2	20	9	93	5	2	0	0
3	21	11	92	5	3	0	0
4	11	8	93	6	1	0	0
5	14	7	93	7	0	0	0
6	8	18	87	8	5	0	0
7	16	17	88	7	2	0	0
8	12	18	84	14	2	0	0
9	12	10	90	10	0	0	0
10	18	13	89	9	2	0	0
11	11	17	83	17	0	0	0
12	8	8	93	6	1	0	0
13	5	17	83	17	0	0	0
14	6	13	91	5	4	0	0
15	7	18	88	6	6	0	0
16	4	7	93	7	0	0	0
17	5	12	89	10	1	0	0
Σ			1519	146	35	0	0

DI: índice de dano.

Tabela 1

Idade, níveis de FAL e valores individuais de DI e de número de células encontradas em cada classe de dano no grupo com PKU.

Paciente com PKU	Média de níveis de FAL	idade (anos)	DI	Classe de dano				
				0	1	2	3	4
1	574.0	10	41	67	26	6	1	0
2	441.1	10	50	59	34	5	2	0
3	410.9	12	48	61	30	9	0	0
4	1003.0	15	68	65	10	18	6	1
5	507.6	15	56	57	33	7	3	0
6	712.3	18	69	50	36	9	5	0
7	664.5	7	92	43	32	17	7	1
8	942.6	11	65	57	27	10	6	0
9	1087.6	9	48	70	17	8	5	0
10	688.8	15	62	67	12	14	6	1
11	199.4	9	51	68	20	6	5	1
12	864.0	25	57	65	19	11	4	1
13	277.9	13	42	74	16	5	4	1
14	555.9	10	38	75	15	7	3	0
15	749.2	24	65	62	20	11	5	2
16	779.2	25	80	43	40	11	6	0
17	997.0	18	76	48	35	11	5	1
18	205.4	3	33	79	13	5	2	1
Σ				1110	435	170	75	10

DI: índice de dano.

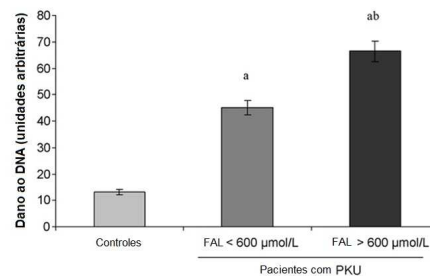


Fig. 2. Danos ao DNA (ensaio cometa) de leucócitos do sangue periférico de dois grupos de pacientes com PKU, um com FAL < 600 µmol/L (n = 8) e outro com FAL > 600 µmol/L (n = 10) e controles (n = 17). Dados representam média ± D.P. (a) p <0,0001 em comparação ao controle, (b) p <0,001 em comparação com o grupo com FAL < 600 µmol/L de FAL (Kruskal-Wallis seguido pelo teste U de Mann-Whitney).

Discussão e Conclusão

Nos últimos anos, vem sendo demonstrado o papel do estresse oxidativo na patogênese da PKU, mostrando a ocorrência de dano oxidativo a lipídios e proteínas (Sirtori et al 2005; Sitta et al 2006; Sitta et al 2009).

Neste trabalho foi demonstrado dano ao DNA em leucócitos de pacientes PKU e também em leucócitos de indivíduos saudáveis incubados com FAL, possivelmente causado por um processo oxidativo. Os achados in vivo e in vitro neste estudo indicam que o dano ao DNA ocorre em pacientes fenilcetonúricos, provavelmente contribuindo com os sintomas neurológicos que acontecem na doença e que este processo está relacionado aos níveis sanguíneos de FAL.

