

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas**  
**Bioquímica**

**ESTRESSE OXIDATIVO NA**  
**FENILCETONÚRIA EXPERIMENTAL**

**Martine Elisabeth Kienzle Hagen**

Orientador

Prof. Dr. Carlos Severo Dutra Filho

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica – como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, 2000

*Graças dou por esta vida, pelo bem que revelou.  
Graças dou por meu futuro e por tudo que passou,  
pelas bênçãos derramadas, pela dor, e na aflição,  
pelas graças reveladas; graças dou por teu perdão.*

*Graças pelo azul celeste e por nuvens que há também,  
pelas rosas no caminho e os espinhos que elas têm,  
pela escuridão da noite, pela estrela que brilhou,  
pela prece respondida e a esperança que falhou.*

*Pela cruz e o sofrimento e a feliz ressurreição,  
pelo amor que é sem medida, pela paz no coração,  
pela lágrima vertida e o consolo que é sem par,  
pelo dom da eterna vida – sempre graças hei de dar.*

TACK, O GUD, FOER VAD SOM VARIT – August Ludwig Storm, 1891, Suécia.  
Trad. Alice O. Denyszczyk, 1961. Mel. TACKSAEGELSE – August Ludwig  
Storm, 1891. Hinário Luterano.

*Ao Everton pelo amor,  
incentivo e apoio constante  
sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao prof. Dutra pela oportunidade, compreensão, paciência ao me ensinar a trabalhar em pesquisa básica, presença constante, empenho e carinho com que orientou este trabalho;

Ao prof. Clóvis que sempre mostrou-se pronto para discussões e sugestões quando solicitado, e pela sua sabedoria que enriquece as reuniões do grupo de erros inatos do metabolismo;

Ao prof. Moacir pelo conhecimento compartilhado no nosso grupo e pelas sugestões que enriqueceram este trabalho;

À prof<sup>a</sup> Angela pelas sugestões que muito contribuíram para a realização deste trabalho e pelos "bons fluídos" que a acompanham;

Às amigas do laboratório 32, Ionara e Sônia, pela troca de experiências e, principalmente, pelo coleguismo;

À prof<sup>a</sup> Raquel Bridi, da Faculdade de Farmácia, pelo auxílio nas técnicas das enzimas;

Às bolsistas Ângela e Carolina pelo auxílio na execução dos experimentos da primeira parte deste trabalho;

Aos funcionários do CEPEA que sempre foram muito gentis e prontamente atenderam aos meus pedidos;

À Cláudia pelo apoio no final da parte prática deste trabalho.

## RESUMO

A fenilcetonúria é causada pela deficiência intensa da atividade da fenilalanina hidroxilase hepática, enzima que converte fenilalanina em tirosina. O bloqueio da conversão da fenilalanina em tirosina resulta no acúmulo tecidual de fenilalanina e seus metabólitos. A doença caracteriza-se por sintomas neurológicos graves tais como retardo mental e convulsões. A fenilcetonúria foi um dos primeiros erros inatos do metabolismo a ser relacionado à doença mental, sendo também a aminoacidopatia mais estudada.

Tem sido sugerido que o estresse oxidativo participa da fisiopatologia de alguns erros inatos de metabolismo devido ao acúmulo de metabólitos tóxicos, à excessiva produção de RLs e à influência de dietas restritas no status antioxidante.

No presente trabalho, nós investigamos alguns parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos com hiperfenilalaninemia experimental. Os animais foram submetidos ao tratamento agudo e crônico (ratos com 6-13 dias de vida) com injeções subcutâneas de  $\alpha$ -metil-DL-fenilalanina e fenilalanina a fim de obter níveis plasmáticos de fenilalanina semelhantes aqueles encontrados em pacientes hiperfenilalaninêmicos. Quimiluminescência, potencial antioxidante total, atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase foram analisadas no cérebro dos animais. Nós também investigamos os efeitos da fenilalanina *in vitro* sobre os mesmos parâmetros em cérebro de ratos de seis dias. Observamos que a quimiluminescência foi aumentada e o potencial antioxidante total foi reduzido em cérebro de ratos hiperfenilalaninêmicos. Dados semelhantes foram obtidos nos experimentos *in vitro* usando várias concentrações de fenilalanina, um fato que indica que o aminoácido induz à produção de radicais livres e compromete a capacidade antioxidante total do tecido nervoso. Além disso, a atividade da catalase foi significativamente inibida pela fenilalanina *in vitro* e no modelo crônico de fenilcetonúria, a atividade da glutathione peroxidase foi reduzida *in vivo* mas não *in vitro* e a atividade da superóxido dismutase não foi alterada nos tratamentos. Os resultados indicam que o estresse oxidativo pode estar envolvido na

neuropatologia da fenilcetonúria. No entanto, posteriores investigações são necessárias para confirmar e estender nossas constatações à condição humana e também determinar se uma terapia antioxidante pode beneficiar estes pacientes.

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>                           | <b>IX</b> |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>                      | <b>X</b>  |
| <b>I. INTRODUÇÃO</b>                              | <b>1</b>  |
| I.1.- Fenilcetonúria                              | 2         |
| I.1.1 - Definição                                 | 2         |
| I.1.2 – Histórico e Frequência                    | 2         |
| I.1.3 – Metabolismo da L-Fenilalanina             | 3         |
| I.1.4 – Causas de Hiperfenilalaninemias           | 6         |
| I.1.5 – Manifestações Clínicas                    | 6         |
| I.1.6 – Diagnóstico                               | 7         |
| I.1.7 – Tratamento                                | 7         |
| I.1.8 – Alterações Bioquímicas e Neuropatológicas | 9         |
| I.1.9 – Modelo Animal de Fenilcetonúria           | 11        |
| I.2 – Radicais Livres                             | 12        |
| I.2.1 – Definição e Generalidades                 | 12        |
| I.2.2 – Estresse Oxidativo                        | 15        |

|   |           |
|---|-----------|
| I.2.2.1 – Mecanismos de Dano Celular por Estresse Oxidativo | 17        |
| I.2.3 – Sistemas de Defesa Antioxidante                     | 20        |
| I.2.3.1 – Enzimas Antioxidantes                             | 21        |
| I.2.4 – Radicais Livres e Sistema Nervoso Central           | 26        |
| I.2.5 – Estresse Oxidativo e Fenilcetonúria                 | 27        |
| <b>II - OBJETIVOS</b>                                       | <b>29</b> |
| <b>III - ARTIGO CIENTÍFICO</b>                              | <b>31</b> |
| <b>IV – DISCUSSÃO</b>                                       | <b>64</b> |
| <b>V – CONCLUSÕES</b>                                       | <b>72</b> |
| <b>VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                      | <b>74</b> |



## LISTA DE FIGURAS

|                     |   |    |
|---------------------|---|----|
| <b>Figura I. 1</b>  | – Reação de oxidação da fenilalanina hidroxilase  | 4  |
| <b>Figura I. 2</b>  | – Catabolismo da fenilalanina   | 5  |
| <b>Figura I. 3</b>  | – Produção do radical hidroxila pela reação de Fenton   | 17 |
| <b>Figura I. 4</b>  | – Produção do radical hidroxila pela reação de Haber-Weiss  | 18 |
| <b>Figura I. 5</b>  | – Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase  | 22 |
| <b>Figura I. 6</b>  | – Dismutação do radical superóxido formando peróxido de hidrogênio  | 23 |
| <b>Figura I. 7</b>  | – Reação catalisada pela glutathione peroxidase   | 24 |
| <b>Figura I. 8</b>  | – Reação de redução da glutathione oxidada  | 24 |
| <b>Figura I. 9</b>  | – Redução do oxigênio   | 25 |
| <b>Figura IV. 1</b> | – Reação de dismutação do superóxido formado pelo sistema xantina/xantina oxidase   | 67 |
| <b>Figura IV. 2</b> | – Reação do peróxido de hidrogênio catalisada pela glutathione peroxidase e redução da glutathione oxidada usando NADPH como coenzima | 68 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| BH <sub>4</sub>               | tetraidrobiopterina;   |
| Ca <sup>2+</sup>              | íon cálcio;  |
| CAT                           | catalase;  |
| Cu <sup>+</sup>               | cobre;   |
| CuZnSOD                       | cobre-zinco superóxido dismutase;                            |
| DHPR                          | diidropteridina redutase;                                    |
| EAN                           | espécies ativas de nitrogênio;                               |
| EAO                           | espécies ativas de oxigênio;                                 |
| EEG                           | eletroencefalograma;   |
| FAD                           | flavina adenina dinucleotídeo;                               |
| Fe <sup>2+</sup>              | íon ferroso;   |
| Fe <sup>3+</sup>              | íon férrico;   |
| FeCl <sub>3</sub>             | cloreto férrico;   |
| GR                            | glutaciona redutase;   |
| GSH                           | glutaciona (forma reduzida);                                 |
| GSH-Px                        | glutaciona peroxidase;                                       |
| GSSG                          | glutaciona (forma oxidada);                                  |
| H <sup>+</sup>                | íon hidrogênio;  |
| H <sub>2</sub> O              | água;  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | peróxido de hidrogênio;                                      |
| HO <sup>•</sup>               | radical hidroxila;   |
| INT                           | cloreto de 2-4 iodofenil-3-(4 nitrofenil)-5-fenil tetrazólio |
| MePhe                         | α-metil-DL-fenilalanina;                                     |
| MnSOD                         | manganês superóxido dismutase;                               |
| Na <sup>+</sup>               | íon sódio;   |
| NAD <sup>+</sup>              | nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada);          |
| NADH                          | nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida);         |
| NADP <sup>+</sup>             | nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada);  |
| NADPH                         | nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida); |
| NO <sup>•</sup>               | óxido nítrico;   |
| NO <sub>2</sub>               | dióxido de nitrogênio  |
| O <sub>2</sub>                | oxigênio molecular;  |
| O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>  | ânion superóxido;  |
| OH <sup>-</sup>               | ânion hidroxila  |
| ONOO <sup>•</sup>             | peroxinitrito;   |
| ONSS                          | óxido nítrico sintases;                                      |
| qBH <sub>2</sub>              | diidrobiopterina quinonóide;                                 |
| QI                            | quociente de inteligência;                                   |
| RL                            | radical livre;   |
| RNM                           | ressonância nuclear magnética;                               |
| -SH                           | grupamento sulfidrila  |
| SOD                           | superóxido dismutase;  |
| TRAP                          | potencial antioxidante total                                 |

# **I. INTRODUÇÃO**

## **I.1 FENILCETONÚRIA**

Desde os estudos de Garrod em 1908, muitos pesquisadores têm descrito doenças metabólicas cujos indivíduos afetados apresentam incapacidade em utilizar nutrientes específicos da alimentação diária. Muitas dessas doenças são de difícil tratamento, como no caso dos distúrbios no catabolismo dos aminoácidos, pois dependem de um manejo dietético específico com a diminuição da oferta do aminoácido envolvido sem prejuízo na ingestão dos demais. A manutenção da oferta balanceada de aminoácidos é necessária para o crescimento e desenvolvimento normais, assim como para reposição das proteínas corporais, principalmente as que possuem alto *turnover*. O sucesso no tratamento dessas doenças é possível, mas depende do diagnóstico pré-natal ou diagnóstico logo após o nascimento (Guthrie, 1996).

### **I.1.1 - Definição**

A fenilcetonúria é um erro inato do metabolismo dos aminoácidos, de caráter autossômico recessivo, causada pela deficiência intensa da atividade da enzima hepática fenilalanina hidroxilase, responsável pela conversão da L-fenilalanina em L-tirosina. Conseqüentemente, há um aumento de L-fenilalanina e seus metabólitos no sangue e nos tecidos dos pacientes. A L-fenilalanina atinge níveis sangüíneos de 1 a 3 mM, que estão associados à disfunção neurológica e retardo mental (Scriver et al., 1995).

### **I.1.2 - Histórico e Frequência**

A fenilcetonúria foi descoberta por Fölling, em 1934, através do teste do cloreto férrico (a adição de  $\text{FeCl}_3$  à urina produz uma cor verde na presença do ácido fenilpirúvico). Fölling analisou a urina de crianças com retardo mental e detectou alguns casos de excreção de ácido fenilpirúvico, propondo, então, uma possível associação entre alguns casos de retardo mental e a presença de fenilpiruvato na urina. O autor sugeriu que a nova doença seria uma desordem do metabolismo da L-fenilalanina, denominando-a "Oligofrenia Fenilpirúvica", posteriormente

denominada "Fenilcetonúria" por Penrose & Quastel em 1937 (Nyhan, 1984).

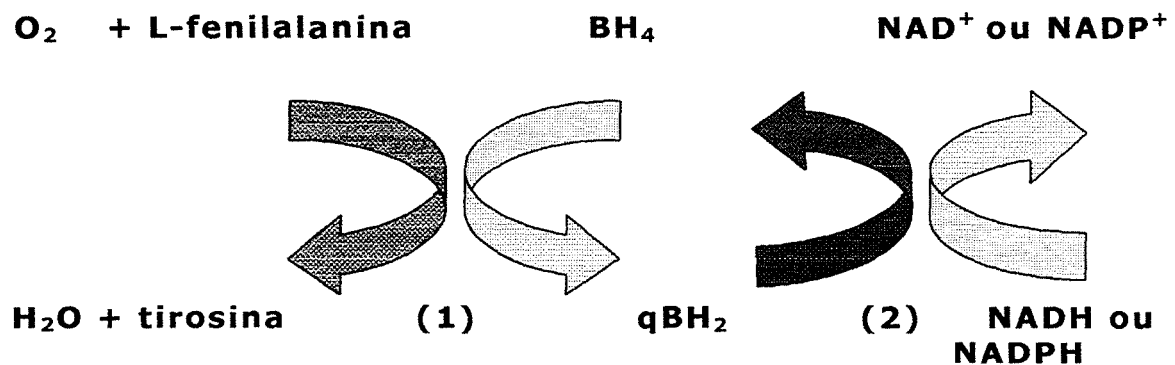
O erro metabólico foi identificado por Jervis (1947) através de experiências que mostraram que a L-fenilalanina proveniente da dieta não era convertida à tirosina e, anos depois, Udenfriend e Cooper (1952) descobriram o sistema enzimático responsável por essa reação, a fenilalanina hidroxilase.

A fenilcetonúria foi um dos primeiros erros inatos do metabolismo a ser relacionado à doença mental, sendo também a aminoacidopatia mais estudada e a mais freqüente, variando entre 1:10.000 a 1:14.000 recém-nascidos vivos. (Scriver et al., 1995).

### **I.1.3 - Metabolismo da L-Fenilalanina**

A L-fenilalanina é um aminoácido nutricionalmente essencial e indispensável à síntese protéica em tecidos de mamíferos (Womack & Rose, 1934). Em indivíduos normais, a L-fenilalanina não utilizada na síntese protéica é convertida à tirosina pela enzima fenilalanina hidroxilase, tendo como cofator a tetraidrobiopterina ( $BH_4$ ) (Nyhan, 1984).

A reação de hidroxilação da L-fenilalanina envolve quantidades equimoleculares de L-fenilalanina,  $BH_4$  e oxigênio sendo os produtos tirosina, diidrobiopterina quinonóide ( $qBH_2$ ) e água. A diidropteridina redutase (DHPR) é a enzima que catalisa a regeneração do  $BH_4$ . Esta reação é dependente de NADH (Scriver & Clow, 1980). A Figura I.1. representa a ação das duas enzimas.



**Figura I.1** – Reação de oxidação da fenilalanina hidroxilase (Scriver & Clow, 1980)

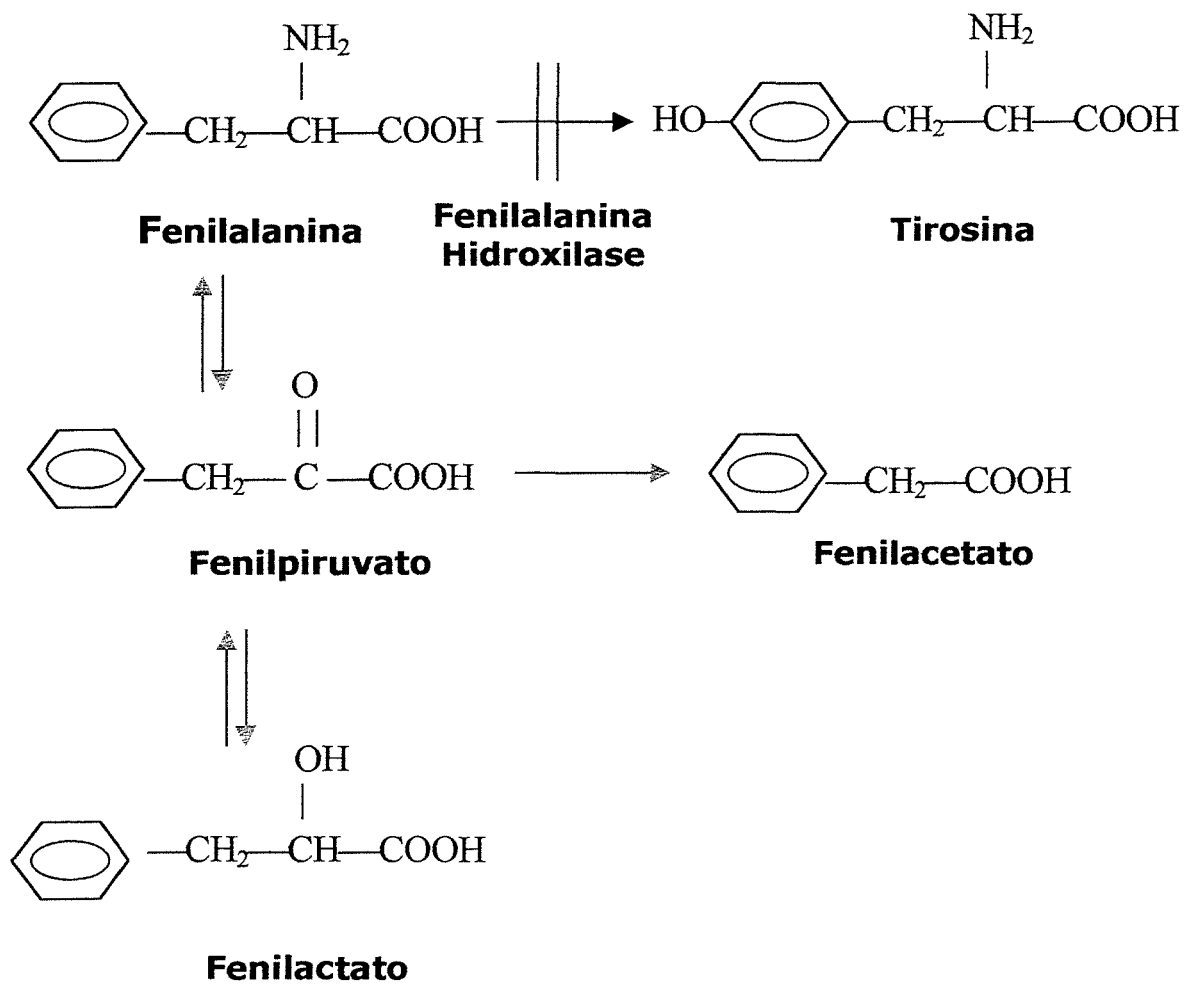
(1) Fenilalanina hidroxilase

(2) Diidropteridina redutase

$BH_4$  - tetraidrobiopterina

$qBH_2$  - diidrobiopterina quinonóide

A L-fenilalanina é convertida, por descarboxilação e transaminação, a metabólitos que são livremente excretados. O bloqueio da rota principal de catabolismo da fenilalanina provoca acúmulo desta e de seus metabólitos (fenilpiruvato, fenilactato, fenilacetato) no sangue e demais tecidos (Scriver et al., 1995). O catabolismo da fenilalanina está representado na Figura I.2.



**Figura I.2.** - Catabolismo da Fenilalanina (adaptado de Nyhan, 1984).

De acordo com Katz et al. (1976), a fenilalanina hidroxilase não está presente no cérebro. A pequena quantidade de L-fenilalanina metabolizada pelo cérebro é hidroxilada à tirosina, pela enzima tirosina hidroxilase, que é convertida à L-DOPA (Kuhar, et al., 1999).

#### **I.1.4 – Causas de Hiperfenilalaninemias**

A hiperfenilalaninemia é definida por níveis plasmáticos de L-fenilalanina acima de 120  $\mu$ M. As causas conhecidas de hiperfenilalaninemia são a deficiência primária da atividade da fenilalanina hidroxilase e bloqueios da síntese de BH<sub>4</sub> ou de sua regeneração.

Entre as várias hiperfenilalaninemias descritas, a fenilcetonúria corresponde àquelas mutações no gene que codifica a enzima fenilalanina hidroxilase, causando elevação plasmática de L-fenilalanina acima de 1,2 mM e alterações neurológicas graves. Já foram descritas mais de 100 mutações no gene que codifica a enzima fenilalanina hidroxilase (Scriver et al., 1995).

#### **I.1.5 - Manifestações Clínicas**

Pacientes com fenilcetonúria apresentam os seguintes sinais e sintomas que se manifestam em maior ou menor intensidade: atraso no desenvolvimento psicomotor, hiperatividade, convulsões, alterações cutâneas tais como eczema, distúrbios de pigmentação, dificuldade para andar e falar, comportamento agressivo, hipotonicidade muscular, tremores, microcefalia, epilepsia, hipoplasia dentária, descalcificação de ossos longos, retardo do crescimento, anormalidades no eletroencefalograma (EEG) (Jervis, 1937; Fois et al., 1955; Paine, 1957; Nyhan, 1979; Pietz et al., 1993).

Pacientes com fenilcetonúria não tratados no primeiro mês de idade apresentam um quociente de inteligência (QI) geralmente menor do que 50 (Tourian & Sidbury, 1983).



### **I.1.6 - Diagnóstico**

O diagnóstico deve ser, se possível no período neonatal, antes do aparecimento dos sintomas já que o dano neurológico é irreversível. O teste de triagem neonatal deve ser realizado após alguns dias de vida, ou seja, após o início da alimentação com proteínas. O diagnóstico é feito pela detecção de altos níveis plasmáticos de L-fenilalanina através de testes qualitativos ou quantitativos. A análise dos níveis de L-fenilalanina e dos sintomas permite o diagnóstico diferencial dos pacientes com fenilcetonúria clássica ou maligna daqueles com hiperfenilalaninemia benigna ou persistente (níveis plasmáticos de L-fenilalanina abaixo de 10 mg/dl), bem como identificar os pacientes com variantes por alteração do cofator da fenilalanina hidroxilase (hiperfenilalaninemia atípica) que requerem tratamento específico (Scriver & Clow, 1980; Giugliani et al., 1986).

O primeiro estudo clínico-laboratorial que permitiu o diagnóstico e acompanhamento de vários pacientes com fenilcetonúria e outros erros inatos de metabolismo no Rio Grande do Sul foi realizado por Wannmacher e colaboradores (1982) utilizando testes de triagem em urina e cromatografia de aminoácidos em papel, em sangue e urina.

Crianças com níveis plasmáticos de L-fenilalanina acima de 1,2 mM (20 mg/dl) e intolerância à L-fenilalanina são classificadas como tendo fenilcetonúria clássica ou hiperfenilalaninemia maligna (Scriver et al., 1995).

### **I.1.7 - Tratamento**

O tratamento consiste na implementação de dieta pobre em L-fenilalanina, o que permite melhorar o prognóstico dos pacientes em relação ao desenvolvimento neuro-psicomotor (Scriver et al., 1995). A interrupção na dieta dos fenilcetonúricos causa elevação brusca dos níveis circulantes de L-fenilalanina e um quadro agudo de intoxicação, com deterioração mental reversível (Woolf, 1979) e alteração de mielinização, visível ao exame de Ressonância Nuclear Magnética (RNM) (Villasana et al., 1989), que são correlacionadas ao quadro clínico

(Ulrich et al., 1994). Técnicas de RNM recentemente desenvolvidas podem medir a concentração de metabólitos no cérebro e são particularmente úteis para investigações de doenças neurometabólicas e neurodegenerativas (Avison et al., 1990; Moller et al., 1995; Pietz et al., 1995; Novotny et al., 1995). Estudos recentes sugerem que a concentração cerebral de L-fenilalanina pode ser utilizada para avaliar a necessidade da continuação da dieta após a adolescência e/ou para determinar a concentração sanguínea individual de L-fenilalanina necessária para manter a concentração cerebral próxima do normal. Assim, o acompanhamento do tratamento e seu sucesso serão baseados na avaliação da concentração cerebral de fenilalanina, cujos níveis deverão permanecer abaixo de 0,25mmol/L (Moats et al., 2000 ; Weglage et al., 2000).

O grau de retardo mental está diretamente relacionado aos níveis de L-fenilalanina, o que exige medidas dietéticas especiais eficazes na tentativa de manter esses níveis abaixo daqueles considerados neurotóxicos. Frequentes reavaliações foram gradualmente baixando esses limites e atualmente aconselha-se manter níveis sanguíneos abaixo de 0,3mM (Scriver et al., 1995).

No entanto, pacientes diagnosticados precocemente e tratados adequadamente também apresentam algum déficit, principalmente no desenvolvimento de aptidões específicas como atenção e percepção. Isso determina a necessidade da continuação de estudos científicos em animais e seres humanos visando ampliar a compreensão dos mecanismos patogênicos que levam às alterações neurológicas e ao retardo mental (Scriver et al., 1995).

Em pacientes adultos, que não fazem a restrição dietética de L-fenilalanina, são encontrados alguns sintomas tais como: aumento da incidência de depressão, sintomas variados de ansiedade, agorafobia, dificuldades psicossociais, entre outros. Estes sintomas psiquiátricos não são correlacionados com o controle dos níveis de L-fenilalanina. Por outro lado, o QI e as medidas de funções executivas, que representam características cognitivas, apresentam correlação com o controle metabólico. Mesmo aumentos transitórios da concentração de L-

fenilalanina no soro podem dar origem a déficits cognitivos transitórios. Segundo alguns autores, a forte correlação entre o QI e o controle metabólico pode fazer do teste de inteligência uma ferramenta importante para avaliar, a longo prazo, a adequação do controle dietético (Estrov et al., 2000).

### **I.1.8 - Alterações Bioquímicas e Neuropatológicas**

A hiperfenilalaninemia é acompanhada por uma redução nos níveis cerebrais de tirosina e outros aminoácidos essenciais causando um distúrbio no sistema de síntese protéica (Hommes, 1989) e alterações no processo de mielinização (Berger et al., 1980). A inibição da captação de aminoácidos neutros pelo tecido nervoso por competição na barreira hemato-encefálica é um mecanismo que pode estar envolvido na toxicidade da L-fenilalanina (Hommes, 1989).

Exames realizados em cérebro de pacientes fenilcetonúricos revelaram redução no peso do cérebro (Alvord et al., 1950), retração nas ramificações dendríticas das células piramidais e redução de espinhas dendríticas no córtex (Bauman & Kemper, 1982), alteração na substância branca (Shah et al., 1972) e menor quantidade de lipídios associados à mielina (Tourian & Sidbury, 1983). Estudos feitos com imagens obtidas através de RNM confirmaram os achados neuropatológicos anteriores, tais como, áreas de vacuolização ou desmielinização da substância branca (Shah et al., 1990).

A redução de mielina tem sido amplamente documentada em pacientes fenilcetonúricos não tratados e em modelos animais da doença (Shah et al., 1972; Berger et al., 1980; Hommes et al., 1982; Taylor & Hommes, 1983). Os exames de RNM têm demonstrado graves anormalidades compatíveis com desmielinização nas áreas parieto-occipital, frontal e sub-cortical (Weglage et al., 2000). Além da deficiência de mielinização, a anatomia patológica da fenilcetonúria inclui gliose e redução da arborização dendrítica (Scriver et al., 1995).

Animais tratados têm sido utilizados para estudar as anormalidades bioquímicas, estruturais e comportamentais induzidas

pela hiperfenilalaninemia (Glick & Greengard, 1980). A hiperfenilalaninemia experimental pode ser desenvolvida em ratos através da administração de L-fenilalanina e de  $\alpha$ -metilfenilalanina, um inibidor da fenilalanina hidroxilase hepática (Greengard et al., 1976). Neste modelo experimental, as doses de  $\alpha$ -metilfenilalanina utilizadas causam inibição da oxidação da L-fenilalanina em torno de 80% sem interferir significativamente com o crescimento dos animais.

Em trabalhos anteriores, realizados em nosso laboratório, foi utilizado este modelo químico experimental pós-natal de fenilcetonúria. Ratos previamente tratados com L-fenilalanina e  $\alpha$ -metilfenilalanina, apresentaram redução na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase de membrana plasmática sináptica (Wyse et al., 1995a), aumento das atividades da piruvatoquinase (Wannmacher, 1995) e da ATP-difosfoidrolase de sinaptossomas de córtex cerebral (Wyse et al., 1994). Por outro lado, estudos *in vitro* demonstraram que a L-fenilalanina tem um efeito inibitório sobre a atividade destas enzimas. Estes resultados podem indicar um aumento da síntese destas enzimas após o tratamento experimental em resposta à inibição de suas atividades causada pela L-fenilalanina.

Rodrigues et al. (1990) realizaram trabalhos *in vitro* demonstrando que a L-fenilalanina inibe a captação de glicose no cérebro, o que sugere que a inibição da piruvatoquinase pela L-fenilalanina esteja envolvida neste processo. Outros estudos *in vitro*, realizados em nosso grupo de Erros Inatos de Metabolismo, demonstraram que a alanina, na presença de L-fenilalanina, foi capaz de reverter o efeito inibitório da L-fenilalanina sobre a atividade das enzimas piruvatoquinase (Wannmacher, 1995) e  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Wyse et al., 1995b).

Em recentes trabalhos, Wyse e colaboradores (1998 e 1999) demonstraram que, por competição, a alanina reverte o efeito inibitório da L-fenilalanina e do fenilactato sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase *in vitro* e *in vivo*. Considerando os resultados destes trabalhos, podemos concluir que provavelmente ocorram alterações na atividade das enzimas estudadas em situações de hiperfenilalaninemia,

contribuindo para o desenvolvimento dos distúrbios neurológicos observados na fenilcetonúria.

### **I.1.9 - Modelo Animal de Fenilcetonúria**

O modelo animal de fenilcetonúria utilizado neste trabalho foi o mesmo empregado em outros trabalhos de nosso grupo de pesquisa (Wannmacher et al., 1995; Wyse et al., 1995) e está baseado no modelo experimental desenvolvido por Greengard et al. (1976). Foi produzido um modelo experimental químico capaz de reproduzir, em ratos, níveis de L-fenilalanina semelhantes aos encontrados na fenilcetonúria em seres humanos. Para isso, administraram-se L-fenilalanina e  $\alpha$ -metilfenilalanina (o inibidor da enzima fenilalanina hidroxilase) em doses e intervalos de acordo com os trabalhos supra citados.

Os ratos Wistar são apropriados para o estudo de crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso central pois o desenvolvimento diário do sistema nervoso do rato é equivalente, aproximadamente, ao que ocorre a cada mês no ser humano (Clark et al., 1993). Eles atingem o desenvolvimento cerebral equivalente ao ser humano recém-nascido, entre o 6º e 8º dia de vida pós-natal (Hommes, 1982), idade em que foram iniciados os tratamentos agudo e crônico. A fase de desenvolvimento rápido estrutural, metabólico e funcional é progressivo desde o nascimento até o final da 4ª semana. Ainda que os modelos químicos experimentais com animais não correspondam exatamente à doença humana, permitem reproduzir alterações metabólicas específicas semelhantes às encontradas nos erros inatos de metabolismo humanos, sendo portanto úteis para o estudo de suas repercussões, como o entendimento da fisiopatologia da doença e a avaliação de medidas terapêuticas a serem propostas para os pacientes.

## **I.2 – RADICAIS LIVRES**

### **I.2.1 – Definição e Generalidades**

Nos átomos, os elétrons ocupam regiões no espaço chamadas níveis de energia ou orbitais onde eles se movimentam sem ganhar ou perder energia. Cada orbital está associado a uma determinada região do átomo e pode suportar no máximo dois elétrons com spins opostos. O spin é a propriedade do elétron de girar em torno do seu próprio eixo e que, por sua vez, cria um campo magnético em torno de si. Os elétrons podem girar no sentido horário ( $1/2$ ) ou anti-horário ( $-1/2$ ), criando campos magnéticos opostos. Quando dois elétrons ocupam um mesmo orbital, dizemos que eles estão pareados e quando ele está sozinho no orbital dizemos que está não pareado (Halliwell, 1990).

Um radical livre é, por definição, um átomo ou molécula com um número ímpar de elétrons no orbital externo e é isto que lhe confere alta reatividade, pois ele possui uma forte tendência de adquirir um segundo elétron no orbital, podendo iniciar reações em cadeia pela retirada de um elétron da molécula vizinha para completar seu próprio orbital (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Portanto, radical livre (RL) é qualquer espécie capaz de existência independente (daí o termo "livre") que contenha um ou mais elétrons sem pareamento (Southorn & Povis, 1988; Halliwell & Gutteridge, 1999).

Os RL podem ser formados pela perda de um elétron por um átomo não radical ou no caso do rompimento de uma ligação covalente se cada um dos átomos envolvidos ficar com um elétron (Halliwell, 1990).

O oxigênio molecular ( $O_2$ ) é um birradical com elétrons não pareados, cada um localizado em um diferente orbital. Esses elétrons possuem spins paralelos, o que confere ao  $O_2$  uma certa estabilidade molecular, impedindo que ele atue como um radical livre (Southorn & Povis, 1988).

Por sua característica birradical, o  $O_2$  pode ser reduzido por quatro sucessivas transferências de um elétron, ou seja, a molécula de oxigênio que pode aceitar um total de quatro elétrons para ser reduzida a duas moléculas de água, recebe um elétron de cada vez (Boveris, 1998). Mais de 90% do  $O_2$  absorvido pelo corpo humano é usado pela citocromo oxidase mitocondrial, que acrescenta quatro elétrons em cada molécula de  $O_2$  para gerar duas moléculas de água. Nos estágios intermediários de redução do  $O_2$ , são formados o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ), correspondendo à redução por um, dois ou três elétrons, respectivamente (Halliwell, 1992).

Os metabólitos produzidos pela redução do  $O_2$  de um em um elétron não são todos radicais livres, conforme a definição, mas possuem alta reatividade e por isso são chamados de espécies ativas de oxigênio (EAO). O  $O_2^{\bullet-}$  e  $HO^{\bullet}$  são radicais livres mas a forma parcialmente reduzida do oxigênio, o  $H_2O_2$ , não é radical (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Uma série de organelas subcelulares são capazes de reduzir parcialmente a molécula de oxigênio a  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$ . A produção primária de ambos os produtos da redução parcial do oxigênio,  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$ , e a produção secundária de  $HO^{\bullet}$  constituem o mecanismo molecular de toxicidade do  $O_2$ . Abaixo, estão relacionadas algumas organelas e reações que constituem as principais fontes de espécies ativas de  $O_2$ :

1 - As mitocôndrias, presentes em todas as células aeróbias, são as mais importantes fontes fisiológicas de radicais superóxido que é dismutado pela ação da Manganês-superóxido dismutase (Mn-SOD), especificamente localizada na matriz mitocondrial;

2 - O retículo endoplasmático contém citocromos, conhecidos como citocromo P450. Os citocromos P450 estão envolvidos na oxidação de diversos substratos com consumo de oxigênio. Podendo gerar  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$ ;

3 - Outras enzimas citosólicas, como a xantina oxidase, produzem também  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$ .

4 - A membrana plasmática é também outro exemplo de fonte de EAO através das reações da lipooxigenase, prostaglandina sintetase e NADPH oxidase, principalmente (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Em células aeróbias, sob condições fisiológicas, as reações de produção de EAO ocorrem a velocidades muito baixas, utilizando apenas 2% do oxigênio total consumido (Boveris, 1998). Isso, somado à existência de sistemas de proteção específicos, determina que a concentração dessas espécies ativas mantenha-se, normalmente, em valores muito baixos nos tecidos (Halliwell, 1990).

Além das EAO, há outros RLs que desempenham um importante papel na fisiologia e patologia humana, são as espécies ativas do nitrogênio (EAN). O óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) é, fisicamente, um RL, considerando o elétron não pareado. Sua característica como RL é limitada, pois não são conhecidas reações de propagação do  $NO^{\cdot}$ . Por outro lado, o  $NO^{\cdot}$  reage facilmente com o radical superóxido produzindo o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), numa reação de terminação da lipoperoxidação (Boveris, 1998).

O  $NO^{\cdot}$  é sintetizado nos organismos vivos, principalmente, por um grupo de enzimas denominado óxido nítrico sintases (ONSs) que convertem o amino ácido L-arginina em L-citrulina e  $NO^{\cdot}$ . A atividade do  $NO^{\cdot}$  é controlada por citocinas, efetores e fatores de sinalização do  $NO^{\cdot}$  para conexão do sistema imunológico com os sistemas cardiovascular, nervoso e endócrino (Bergendi et al., 1999).

Boveris (1998) descreve cinco reações metabólicas que podem envolver a participação do  $NO^{\cdot}$  no coração e músculos. As que ocorrem na mitocôndria com a citocromo oxidase, o ubiquinol e o  $O_2^{\cdot-}$  e outras reações com a mioglobina citosólica e a hemoglobina extracelular.

Algumas dessas reações são de importante significado biológico. As reações do  $NO^{\cdot}$  com a citocromo oxidase inibem a principal via de



captação de  $O_2$  e produção de energia e as reações com ubiquinol produzem ubisemiquinona que, por autooxidação, produz  $O_2^{\bullet}$  e funciona como reação de iniciação de formação de RLs.

O  $ONOO^-$  é formado em meio ácido e transformado em ácido peroxinítrico que, espontaneamente, forma uma espécie com propriedades de radical hidroxila, considerado o radical mais citotóxico. Os nitratos são os produtos finais dessas reações (Bergendi et al., 1999).

### **I.2.2 – Estresse Oxidativo**

O estresse oxidativo pode ser definido como “um distúrbio do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante em favor do pró-oxidante, levando ao dano potencial” (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Em princípio, o estresse oxidativo pode resultar de:

1 – Diminuição dos antioxidantes – por exemplo: diminuição da atividade das enzimas de defesa antioxidante como cobre-zinco superóxido dismutase (CuZnSOD), manganês-superóxido dismutase (MnSOD) ou glutathiona peroxidase (GSH-Px) ou a deficiência nutricional de antioxidantes ou outros constituintes dietéticos essenciais pela inadequada ingestão ou absorção dos nutrientes da dieta (alfa-tocoferol, ácido ascórbico, aminoácidos contendo enxofre necessário para a síntese de glutathiona, ou riboflavina, necessária para a produção de FAD, um cofator da glutathiona redutase);

2 – Produção aumentada de EAO/EAN, pela exposição elevada ao  $O_2$ , a presença de toxinas que são metabolizadas produzindo EAO/EAN, ou excessiva ativação de sistemas “naturais” de produção de EAO/EAN como a ativação indevida de células fagocíticas nas doenças crônicas inflamatórias, como artrite reumatóide ou colite ulcerativa (Halliwell & Gutteridge, 1999).

De acordo com os fatores envolvidos, o dano causado pelo estresse oxidativo pode ser dividido em quatro grupos (Bergendi et al., 1999):

- 1 – Fatores genéticos – ex.: anemia de Fanconi;
- 2 – Combinação de fatores genéticos e ambientais – ex.: lupus eritematoso sistêmico;
- 3 – Fatores ambientais – ex.: arteriosclerose;
- 4 – Distúrbio de fluxo sanguíneo aos tecidos – ex.: isquemia-reperfusão.

O estresse oxidativo pode resultar em adaptação ou injúria celular. Na adaptação, as células podem tolerar um grau leve de estresse oxidativo que, freqüentemente, resulta em aumento da síntese dos sistemas de defesas antioxidantes na tentativa de restabelecer o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante. A injúria celular pode ser definida como “o resultado de um estímulo químico ou físico, que em excesso ou em deficiência, pode alterar provisória ou permanentemente a homeostase da célula”. A injúria pode ser reversível quando a célula entra num prolongado e temporário *steady-state* que não leva à morte celular (Halliwell & Gutteridge, 1999).

O estresse oxidativo pode causar dano a todos os tipos de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios (lipoperoxidação). O principal alvo celular do estresse oxidativo pode variar dependendo da célula, do tipo de estresse imposto e da intensidade do estresse. O estresse oxidativo intenso pode produzir danos irreversíveis levando à morte celular (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Existe uma significativa interrelação entre os danos oxidativos e o metabolismo energético mitocondrial, especialmente no caso da fosforilação oxidativa que é geradora de grande parte dos RLs na célula. Os principais componentes geradores destes RLs são a ubiquinona e o citocromo *c* oxidorreductase (citocromo *b566*), sendo esta geração

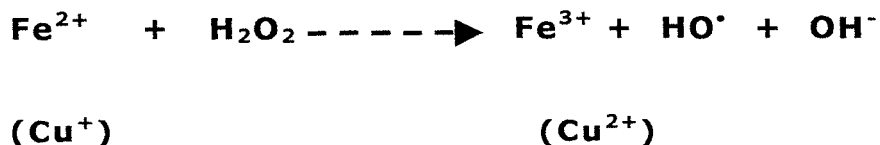
aumentada pela inibição da cadeia de transporte de elétrons. Por outro lado, o próprio sistema de fosforilação oxidativa é vulnerável aos danos causados pela ação dos RLs, principalmente aqueles que atingem o DNA mitocondrial (Bowling & Beal, 1995).

### **I.2.2.1 – Mecanismos de Dano Celular por Estresse Oxidativo**

#### **Lipoperoxidação**

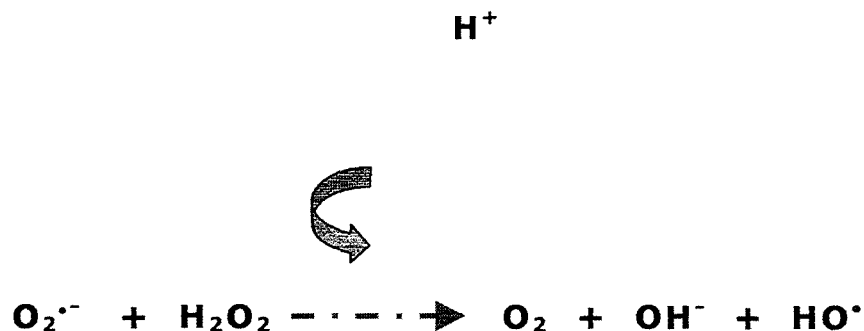
A lipoperoxidação é um processo fisiológico contínuo que ocorre nas membranas celulares. Além de ser um fator de renovação da membrana, este processo é essencial na síntese de prostaglandinas e leucotrienos, bem como na fagocitose e pinocitose.

O radical hidroxila é provavelmente a mais potente das EAO e o provável iniciador das reações em cadeia que formam lipoperóxidos e radicais orgânicos (Halliwell, 1992). As Figuras I.3 e I.4 mostram as reações de produção do radical hidroxila.



#### **Figura I. 3 – Produção do radical hidroxila pela reação de Fenton.**

Nesta versão simplificada, verifica-se a transferência de um único elétron produzindo o radical hidroxila. Essa reação explica a catálise da decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelo ferro, onde o ferro, em estado ferroso, passa para um estado de oxidação imediatamente superior, o estado férrico. Outros metais, como o cobre (Cu<sup>+</sup>), também podem servir como doadores de elétrons na reação de Fenton (Pryor, 1970).



**Figura I. 4 – Produção do radical hidroxila pela reação de Haber-Weiss** – o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é reduzido formando o  $\text{HO}^\bullet$  mediante a transferência de um elétron do íon superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ), em presença de íons ferro. Em condições fisiológicas esta reação é bastante lenta e, portanto, o radical hidroxila é formado principalmente pela reação de Fenton.

Quimicamente, RLs são caracterizados por sustentar reações em cadeia de RLs, uma espécie de propagação própria de reações em que um RL reage produzindo um outro RL que também reage dando origem a um outro RL. Estes mecanismos alimentadores de processos químicos são conhecidos como reações de propagação e são o centro das reações em cadeia de RLs. Classicamente, as reações dos RLs são divididas em :

- 1) Reações de iniciação;
- 2) Reações de propagação; e
- 3) Reações de terminação.

Nas reações de iniciação, um RL é formado de uma espécie química estável não-radical livre ( $\text{RH} \rightarrow \text{R}^\bullet$ ). Nas reações de propagação, também chamadas de reação central, um RL reage com uma molécula estável originando outro RL como produto ( $\text{R}^\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{ROO}^\bullet$  e  $\text{ROO}^\bullet + \text{RH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{R}^\bullet$ ). Nas reações de terminação, dois RLs anulam seus elétrons solitários formando um produto estável ( $\text{ROO}^\bullet + \text{R}^\bullet \rightarrow \text{ROOR}$  ou  $\text{R}^\bullet + \text{R}^\bullet \rightarrow \text{R} - \text{R}$  (Boveris, 1998).

A degradação das primeiras moléculas em RLs necessita, relativamente alta energia de ativação, mas as subsequentes reações de decomposição utilizam muito menos energia (Bergendi et al., 1999).

No final, o ataque de um RL reativo às membranas pode oxidar múltiplas cadeias laterais de ácidos graxos a lipoperóxidos danificando proteínas, produzindo "fendas" ou, eventualmente, causando o completo rompimento da membrana (Halliwell, 1992; Halliwell, 1990). A elevação de ácidos graxos livres e perda de colesterol e lipídios pela lipoperoxidação podem danificar a célula e/ou afetar processos fisiológicos pela alteração da estrutura da membrana, permeabilidade, fluidez e função (Halliwell & Gutteridge, 1990).

A lipoperoxidação produz aldeídos, gases hidrocarbonados e vários resíduos químicos, como o malondialdeído, dieno conjugado e 4-hidroxinonenal.

Os efeitos da lipoperoxidação sobre as membranas podem ser de quatro tipos:

1 - mudanças no microambiente lipídico afetando enzimas ligadas à membrana, canais iônicos ou receptores, aumentando ou diminuindo suas atividades;

2 - formação de novos canais de membrana, alterando sua permeabilidade;

3 - formação de ligações cruzadas entre proteínas e fosfolipídios, inativando-os irreversivelmente;

4 - oxidação dos grupos -SH nos sítios ativos de enzimas ligadas à membrana, acarretando perda de suas propriedades funcionais.

A intensidade desses efeitos pode causar alterações nas propriedades funcionais da membrana e até mesmo a morte celular (Meerson et al., 1982).

A suscetibilidade dos tecidos à lipoperoxidação é dependente do nível de estresse oxidativo a que estão sujeitos, da quantidade de substrato a ser peroxidado (ácidos graxos poliinsaturados) e do nível de defesas antioxidantes. Mesmo não sendo a causa primária de doenças, a lipoperoxidação é prejudicial já que pode provocar danos teciduais secundários importantes (Halliwell & Gutteridge, 1990).

### **Dano às Proteínas**

O ataque às proteínas causa, principalmente, a oxidação de grupamentos sulfidril (-SH) e metionil formando ligações cruzadas entre proteínas levando à desnaturação. As mudanças conformacionais decorrentes reduzem a atividade ou inativam enzimas, por exemplo (Webster & Nunn, 1988). Algumas consequências da oxidação de proteínas são o dano a receptores, vias de transdução de sinal, transporte, entre muitas outras. As proteínas oxidadas podem ser reconhecidas como "corpo estranho" pelo sistema imune, desencadeando a formação de anticorpos e talvez autoimunidade (ex.: artrite reumatóide). O ataque de várias EAO (ex.: ONOO<sup>-</sup> e NO<sub>2</sub>) sobre a tirosina leva à produção de 3-nitrotirosina. Também pode ocorrer a nitração da fenilalanina e do triptofano (Halliwell & Gutteridge, 1990).

### **Dano ao DNA**

O DNA sofre ataque das EAO induzindo a mutações, de grande importância na carcinogênese. O maior dano ocorre pelo ataque à pirimidina na ligação com a desoxirribose. Há o rompimento da ligação glicose-fosfato, com liberação de bases livres dos nucleotídeos. É possível que essa lesão ao DNA ou sua reparação imperfeita cause a ativação de oncogenes, desencadeando a evolução de neoplasias (Halliwell, 1989).

### **I.2.3 – Sistemas de Defesa Antioxidante**

Os organismos aeróbios possuem sistemas de defesa para proteger-se contra os efeitos causados pelas EAO. Substâncias que neutralizam a ação dos RLs na fase de iniciação ou propagação da

lipoperoxidação, levando à formação de produtos menos tóxicos, são chamadas de seqüestradoras (*scavengers*) como as enzimas e tocoferóis. Aquelas que atuam absorvendo a energia de excitação dos RLs, neutralizando-os, são chamadas de *quenchers* como os carotenóides e ácido ascórbico (Machlin & Bendich, 1987).

O sistema de defesa antioxidante compreende:

1 - as enzimas antioxidantes, que evitam o acúmulo de  $H_2O_2$  e  $O_2^*$ , para que não haja a produção do radical hidroxila, contra o qual não existe nenhum sistema enzimático de defesa;

2 - agentes quelantes e proteínas, como a transferrina e a ceruloplasmina, que transportam ferro e cobre, respectivamente, impedindo que estes metais sejam liberados e catalisem a formação de espécies oxidantes;

3 - substâncias de baixo peso molecular que sequestram as EAO e EAN como, por exemplo, a bilirrubina, o  $\alpha$ -tocoferol e o ácido úrico. Alguns antioxidantes de baixo peso molecular vêm da dieta, especialmente ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol. Há uma relação direta entre nutrição adequada e níveis de defesa antioxidante normais;

4 - proteínas que protegem biomoléculas contra danos, inclusive o dano oxidativo, por outros mecanismos como por exemplo as proteínas de choque térmico (Halliwell & Gutteridge, 1999).

#### **I.2.3.1 - Enzimas Antioxidantes**

No sistema enzimático de defesa contra os RLs formados nos processos oxidativos, salientam-se três enzimas: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px). Essas enzimas funcionam como sequestradores de RLs protegendo as membranas celulares da lipoperoxidação, mantendo assim, baixas

concentrações intracelulares dessas moléculas altamente reativas (Boveris & Chance, 1973).

### **CATALASE**

Esta enzima está presente em todos os tipos de células de mamíferos e está localizada, principalmente, num componente subcelular chamado peroxissoma. Alguns órgãos como o coração, músculo esquelético e cérebro contêm níveis mais baixos de catalase do que o fígado, por exemplo, e estão mais expostos aos danos provocados pelos RLs (Boveris & Chance, 1973). A Figura I. 5 mostra a reação de decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela catalase.



**Figura I. 5**– Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase.

### **SUPERÓXIDO DISMUTASE**

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima essencial para todas as células aeróbias pois catalisa a dismutação do radical superóxido, importante EAO, formando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> (Figura I. 6).

Existem três tipos de superóxido dismutase:

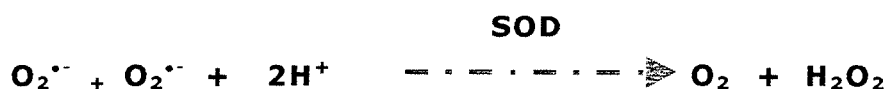
1) as que contêm cobre e zinco no sítio ativo (CuZn-SOD) e que são encontradas no citoplasma (enzima com duas subunidades, cada uma contendo um átomo de cobre e um átomo de zinco) e nos fluídos celulares (EC-SOD; enzima tetramérica com quatro unidades de cobre e quatro de zinco, que é secretada pelas células endoteliais);

2) as que contêm manganês (Mn-SOD), presentes na matriz mitocondrial, apresentando um átomo de manganês por subunidade; e



3) as que contêm ferro, que são encontradas em plantas e bactérias (procariotos) (Fridovich, 1975; Chance et al., 1979)

Este grupo de enzimas catalisa a reação de dois radicais superóxido, com conseqüente formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que é menos reativo e é degradado por outras enzimas (catalase ou glutathiona peroxidase).



**Figura 1. 6** - Dismutação do radical superóxido formando peróxido de hidrogênio e oxigênio.

Essa reação pode acontecer espontaneamente em pH fisiológico, porém quando catalisada pela SOD a velocidade de dismutação é 10<sup>4</sup> vezes maior (Chance et al., 1979; Southorn & Pavis, 1988).

### **GLUTATIONA PEROXIDASE**

A glutathiona peroxidase (GSH-Px), quando foi descoberta por Mills em 1957, era considerada uma enzima responsável apenas pela catálise do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tal como a CAT. Hoje, esta enzima que é encontrada em muitos tecidos animais, é considerada como um dos principais sistemas de defesa antioxidante. A enzima reage com uma variedade de hidroperóxidos orgânicos assim como com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wendel, 1981).

Há dois tipos de GSH-Px:

- 1) a que utiliza o selênio como cofator, encontrada tanto na mitocôndria quanto no citosol; e
- 2) a que não depende de selênio, encontrada no citosol e responsável pela metabolização de hidroperóxidos orgânicos.

A GSH-Px catalisa a reação de hidroperóxidos com a glutathiona reduzida (GSH) para formar glutathiona oxidada (GSSG) e o produto de redução do hidroperóxido (Figura I. 7).

Fisiologicamente, a GSH-Px atua acoplada à enzima glutathiona redutase (GR) que, por sua vez, catalisa a redução de GSSG, usando NADPH como coenzima (Figura I. 8) (Mills, 1960; Maiorino et al., 1990).

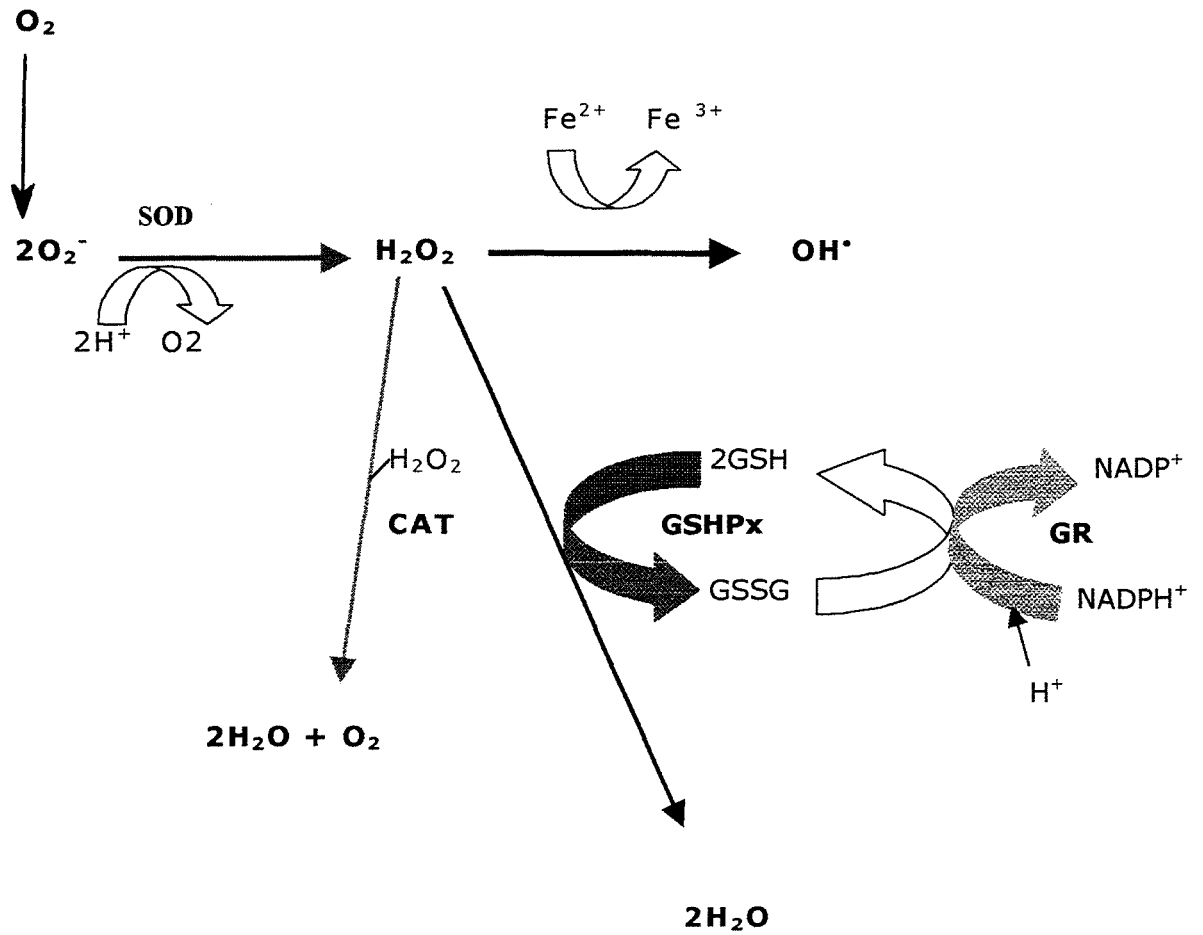


**Figura I. 7** - Reação catalisada pela GSH-Px. O substrato também pode ser outros hidroperóxidos além do  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Figura I. 8** - Reação de redução da GSSG pela glutathiona redutase, usando NADPH como coenzima.

A Figura I. 9 mostra a redução do  $O_2$  à água, os sítios de formação de RLs e a ação das enzimas antioxidantes



**Figura I. 9** – Redução do  $O_2$  à água (adaptado de Marks et al., 1996).

#### **I.2.4 – Radicais Livres e Sistema Nervoso Central**

Todos os organismos aeróbios podem sofrer dano oxidativo. Porém, o tecido nervoso é mais suscetível em comparação a outros tecidos. Uma das razões é o seu alto consumo de O<sub>2</sub> em humanos já que é responsável por aproximadamente 20% do consumo basal de O<sub>2</sub> do corpo, apesar de seu peso corresponder a 2% do peso corporal. Portanto, há uma grande quantidade de O<sub>2</sub> para uma massa de tecido relativamente pequena (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Além disso, outros fatores também contribuem para tornar o cérebro vulnerável às reações de oxidação, pois:

- 1) contém altas concentrações de lipídios poliinsaturados, que servem como substrato para a peroxidação lipídica;
- 2) é relativamente deficiente de mecanismos protetores, sendo que os baixos níveis de enzimas antioxidantes e sua localização nas células gliais fazem com que os neurônios sejam menos protegidos contra os oxidantes presentes no cérebro;
- 3) em regiões específicas do cérebro (*substância nigra, caudato, putamen e globus pallidus*) o ferro encontra-se presente em altas concentrações, o que favorece a lipoperoxidação;
- 4) a morte celular ou o colapso do gradiente iônico normal podem causar enorme liberação de glutamato, levando ao excessivo e contínuo aumento de Ca<sup>2+</sup> livre intracelular e Na<sup>+</sup> em neurônios adjacentes ocasionando alta produção de NO<sup>•</sup> e geração aumentada das EAO (Resnick & Parker, 1993; Cassarino & Bennet Jr., 1999).

Quantidades elevadas de RLs têm sido associadas a muitas doenças e distúrbios neurológicos tais como doença de Batten, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, convulsões, demência, derrame

cerebral, isquemia, doença de Hallervorden-Spatz, esclerose amiotrófica lateral e edema cerebral (Bondy, 1996; Delanty & Dichter, 1998).

Estudos de isquemia cerebral seguida de reperfusão têm demonstrado claramente o envolvimento dos RLs e da lipoperoxidação no dano neuronal que ocorre em situações de bloqueio do metabolismo energético aeróbio. Além disso, o uso de agentes inibidores da formação de RLs melhora a sobrevivência dos animais submetidos à isquemia cerebral (Floyd, 1990; Carney et al., 1992).

### **1.2.5 – Estresse Oxidativo e Fenilcetonúria**

O estresse oxidativo tem sido sugerido como um participante na fisiopatologia de alguns erros inatos de metabolismo devido ao acúmulo de metabólitos tóxicos, à excessiva produção de RLs e à influência de dietas restritas no *status* antioxidante.

Wilke e colaboradores (1992), verificaram que pacientes com fenilcetonúria sob dieta restrita em fenilalanina apresentavam baixos níveis de selênio eritrocitário e baixa atividade da GSH-Px sem apresentar sintomas sugestivos de deficiência de selênio. Estes pesquisadores demonstraram que a deficiência de selênio e GSH-Px estão associados ao aumento de lipoperoxidação no plasma, através da avaliação de produtos como malondialdeído. Este fato foi inicialmente explicado como resultado da deficiência de selênio, devido à pobre ingestão dietética deste mineral.

Entretanto, um estudo recente mostrou que após suplementação de selênio, vitaminas e oligoelementos, crianças com fenilcetonúria ou com hiperfenilalaninemia leve continuaram apresentando deficiência na atividade da GSH-Px. Distúrbios neuropsicológicos foram mais freqüentes em pacientes com fenilcetonúria e baixa atividade da GSH-Px do que em pacientes com fenilcetonúria e atividade normal da GSH-Px. Os autores sugerem algumas possíveis explicações para a atividade diminuída da GSH-Px na fenilcetonúria como a reduzida disponibilidade

de glutationa, que é o substrato da enzima, ou de selênio além da inibição direta da atividade da GSH-Px pelos altos níveis de L-fenilalanina (Sierra et al., 1998).

Longhi e colaboradores (1987) confirmaram observações prévias de como a deficiência de micronutrientes pode ser prejudicial e como é alto o risco de deficiência de certos micronutrientes em pacientes com fenilcetonúria submetidos à dieta semi-sintética. O risco é particularmente acentuado para ferro, cobre, zinco e selênio.

Em pesquisa recente, Moyano e colaboradores (1997) verificaram a extensão do dano oxidativo causado por vários erros inatos de metabolismo através da medida do tocoferol, que é um antioxidante conhecido. Os níveis de tocoferol encontrados foram especialmente baixos em pacientes com erros inatos do metabolismo energético não tratados. Em crianças com fenilcetonúria, foram demonstrados níveis sanguíneos de tocoferol semelhantes aos das crianças com hiperfenilalaninemia leve. No entanto, adolescentes que abandonaram o tratamento por alguns anos, apresentaram níveis de tocoferol no limite mínimo da taxa normal. Os pacientes foram tratados com tocoferol e, após o tratamento, os níveis deste antioxidante foram novamente avaliados. Os pesquisadores demonstraram que o tratamento com tocoferol corrigiu a deficiência de antioxidantes apresentada nas doenças estudadas, recomendando um tratamento com este antioxidante monitorado bioquimicamente.

## **II. OBJETIVOS**

- Verificar o efeito *in vitro* da fenilalanina em homogeneizado de cérebro de ratos sobre parâmetros de estresse oxidativo - quimiluminescência e potencial antioxidante total (TRAP) e sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase;
- Verificar os mesmos parâmetros em modelos animais agudo e crônico de fenilcetonúria.



### **III. ARTIGO CIENTÍFICO**

**Oxidative stress in brain of induced  
phenylketonuric rats.**

Submetido à *Free Radical Biology & Medicine*

## **Oxidative stress in brain of rats with chemically induced phenylketonuria**

**MARTINE E. KIENZLE HAGEN, CAROLINA D. PEDERZOLLI, ANGELA M. SGARAVATTI,  
RAQUEL BRIDI<sup>#</sup>, MOACIR WAJNER, CLÓVIS M. D. WANNMACHER, ANGELA T. S. WYSE AND  
CARLOS S. DUTRA-FILHO\***

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde and <sup>#</sup>Departamento de Produção de Matéria-prima, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil.

\*Corresponding Author

Address Correspondence to:

Carlos Severo Dutra Filho

Departamento de Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos, 2600 (Anexo)

90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telephone number : +55-51 316-5573

FAX number: +55-51 316-5535

E-mail: [dutra@ufrgs.br](mailto:dutra@ufrgs.br)

## **Oxidative stress in brain of rats with chemically induced phenylketonuria**

**Abstract** - Tissue accumulation of L-phenylalanine (Phe) is the biochemical hallmark of human phenylketonuria (PKU), an inherited metabolic disorder clinically characterized by mental retardation and other neurological features. The mechanisms of brain damage observed in this disorder are poorly understood. In the present study we investigated some oxidative stress parameters in the brain of rats with experimental hyperphenylalaninemia. The animals were subjected to acute or chronic (6-13 day-old rats) subcutaneous injections of  $\alpha$ -methyl-DL-phenylalanine and Phe in order to achieve plasma Phe levels similar to those of the human condition. Chemiluminescence, total radical-trapping antioxidant potential (TRAP), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities were measured in the brain of the animals. We also investigated the *in vitro* effects of Phe on the same parameters in the brain of 6-day-old rats. We observed that chemiluminescence is increased and TRAP is reduced in the brain of hyperphenylalaninemic rats. Similar data were obtained in the *in vitro* experiments using Phe at various concentrations, a fact that indicates that the amino acid induces free radical production and compromises total antioxidant capacity in nervous tissue. Moreover, CAT activity was significantly inhibited by Phe *in vitro* and in the chronic model of PKU, whereas GSH-Px activity was reduced *in vivo* but not *in vitro* and SOD activity was not altered by any treatment. The results indicate that oxidative stress may be involved in the neuropathology of PKU. However, further studies are necessary to confirm and extend our findings to the human condition and also to determine whether an antioxidant therapy may be of benefit to these patients.

**Keywords:** phenylketonuria, phenylalanine, brain, central nervous system, oxidative stress, free radical.

## INTRODUCTION

Phenylketonuria (PKU) is the most frequent inherited disorder of amino acid metabolism. PKU is caused by a severe deficiency of hepatic phenylalanine hydroxylase activity resulting in accumulation of L-phenylalanine (Phe) and its metabolites in blood and other tissues [1]. Permanent brain damage in this disease has been associated with increased Phe levels during critical periods of brain development [2,3]. Unless diagnosed and treated very early in infancy, this condition leads to severe retardation of intellectual development, neuropsychiatric symptoms and seizures. Although long-term therapy with a Phe-restricted diet may prevent these symptoms [4], intellectual and school performance depend on good dietary compliance, which may be difficult to achieve [5]. Therefore, it would be desirable to develop alternative therapeutic approaches that could counteract the toxic effects of Phe, mainly in patients with poor compliance [6].

Some mechanisms have been proposed to explain the pathophysiology of the neurological dysfunction characteristic of PKU. Severe reduction in the amount of myelin, retarded synapse formation and decreased dendritic arborization have been described in human and experimental PKU [7,8]. Phe affects brain protein synthesis due to polysome disaggregation and inhibition of translation initiation [9,10]. In addition, Phe disturbs the transport of various neutral amino acids into the brain, possibly reducing their availability for protein and neurotransmitter synthesis [11,12,13,14,15]. We have previously demonstrated some biochemical alterations in the brain of hyperphenylalaninemic rats chronically treated with daily administration of Phe plus  $\alpha$ -methyl-DL-phenylalanine (MePhe), a phenylalanine hydroxylase inhibitor. These alterations include

reduced Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the synaptic plasma membrane [16,17], decreased high molecular weight neurofilament subunit (NF-H) content and increased phosphorylation of the 150 kDa neurofilament subunit (NF-M) and tubulins present in the cytoskeletal fraction [18]. Finally, brain energy metabolism is impaired by Phe in vitro [19], a fact that is also observed in patients [20]. However, despite these studies, the mechanisms by which Phe causes brain damage are poorly understood to date.

Oxidative stress is an important event that has been related to the pathogenesis of some diseases affecting the central nervous system such as neurodegenerative disorders, epileptic seizures, demyelination (multiple sclerosis), dementia, and others [21,22]. This is understandable since the central nervous system is highly sensitive to oxidative stress due to its high oxygen consumption, its high iron and lipid contents, especially polyunsaturated fatty acids, and the low activity of antioxidant defenses [23].

Several authors have reported low selenium levels in plasma of hyperphenylalaninemic patients probably secondary to the protein restricted diet imposed to these children in order to achieve normal plasma Phe levels [24,25,26,27]. A more recent evaluation of hyperphenylalaninemic patients found that, although a normal plasma level of selenium was seen in these patients, a significantly lower activity of erythrocyte GSH-Px was detected [26]. Considering that selenium is essential to GSH-Px activity, selenium supplementation of the diet of these patients should be an adjunct therapy in situations of selenium deficiency. Another study demonstrated that PKU patients present elevated products of lipid peroxidation in plasma and diminished activities of plasma and erythrocyte GSH-Px [28]. These findings indicate that other factors may influence GSH-Px activity in PKU. Moreover, decreased serum ubiquinone-10 levels were recently observed in PKU patients [29]. Therefore, oxidative stress may be related to brain damage in PKU, but the exact mechanisms underlying these effects remain to be elucidated.

In the present study we investigated various parameters of oxidative stress in the brain of rats subjected to chemically induced PKU, namely chemiluminescence, total radical-trapping antioxidant potential (TRAP), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities. We also examined the *in vitro* effects of Phe on the same parameters in the brain of 6-day-old rats. The results revealed alterations of various of these parameters, indicating that oxidative stress may be one of the mechanisms by which Phe provokes brain damage in PKU. Further studies on the oxidative stress status of PKU patients appear to be worthwhile in order to determine whether an antioxidant therapy may be of benefit to these patients.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Reagents and equipment*

All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA, except for the RANSOD kit which was purchased from RANDOX. Phe and MePhe were dissolved on the day of the experiment in distilled water for *in vitro* assays, and in saline for subcutaneous administration with the pH adjusted to 7.4 when necessary. Chemiluminescence and TRAP were assayed using a beta liquid scintillation spectrometer (Tricarb 2100 and Wallac model 1409, respectively) and the enzyme activities were measured with a double-beam spectrophotometer with temperature control (Hitachi U-2001).

## *Animals*

Six- to 14-day-old Wistar rats bred in the Department of Biochemistry, UFRGS, were used. Rats were kept with dams while receiving the drugs until they were sacrificed. The dams had free access to water and to a standard commercial chow (Germani, Porto Alegre, RS, Brazil) containing 20.5% protein (predominantly soybean), 54% carbohydrate, 4.5% fiber, 4% lipids, 7% ash and 10% moisture. Temperature was maintained at  $24 \pm 1$  °C, with a 12-12 h light-dark cycle. The “Principles of laboratory animal care” (NIH publication n° 85-23, revised 1985) were followed in all the experiments.

## *Tissue preparation*

On the day of the experiments, animals were killed by decapitation without anesthesia and the brain was immediately removed. The olfactory bulbs and pons/medulla were discarded. The rest of the brain (forebrain or cerebrum) was weighed and kept chilled until homogenization. The brain was homogenized in the incubation medium used for each technique and centrifuged at 1,000 g for 10 minutes at 4° C, and the supernatant was immediately used for the measurements. For the enzyme activity determinations, the brain tissue was kept frozen at -74°C for up to one week.



### *Chemically induced phenylketonuria*

We induced PKU in rats as described by Wyse *et al.* [16,17]. Suckling animals received subcutaneous injections of 2.1  $\mu\text{mol}$  Phe plus 1.6  $\mu\text{mol}$  MePhe per gram body weight. The substances were dissolved in saline by heating. Controls received equivalent volumes of saline. The acute model consisted of one injection of MePhe on the 6<sup>th</sup> day of life and Phe on the 7<sup>th</sup> day (after a 24 hour interval). To produce the chronic PKU model, rats received the drugs from the 6<sup>th</sup> to the 13<sup>rd</sup> day. The same doses utilized in the acute treatment were used. MePhe was administered once a day and Phe two times daily (with a 9 hour interval). Rats were killed 14 hours after the last injection of Phe.

### *In vitro experiments*

Brain homogenates were incubated for 1 hour at 37° C in the presence of Phe or MePhe, and controls were incubated with medium only. The final concentrations of each substance in the incubation medium ranged from 0.5 to 5 mM. After incubation, aliquots were taken to measure chemiluminescence and TRAP. To test the action of Phe on the enzymatic antioxidant defenses (CAT, SOD and GSH-Px), the amino acid was added to the incubation medium at the time of assay of each enzyme activity without previous incubation with tissue homogenate.

### *Chemiluminescence*

Samples were assayed for chemiluminescence in a dark room by the method of Gonzalez-Flecha *et al.* [30]. Incubation flasks contained 3.5 ml of medium consisting of 20 mM sodium phosphate, pH 7.4, and 140 mM KCl. The background chemiluminescence was measured and 0.5 ml of homogenate immediately added. Chemiluminescence was measured for 30 minutes at room temperature. The background chemiluminescence was subtracted from the total value and the results are represented as cps/mg protein.

### *Total radical-trapping antioxidant potential (TRAP)*

TRAP represents the total antioxidant capacity of the tissue and was determined by measuring the luminol chemiluminescence intensity induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) (ABAP) [31] at room temperature. Tissue was homogenized 1:10 (w/v) in 0.1 M glycine buffer, pH 8.6, which was also used to prepare the other solutions. Four ml of 10 mM ABAP were added to the vial and the background chemiluminescence was measured. Ten  $\mu$ l of 4 mM luminol were then added and the chemiluminescence was measured. This was considered to be the initial value. Ten  $\mu$ l of 80  $\mu$ M Trolox or homogenates were added and chemiluminescence was measured until it reached the initial levels. The addition of Trolox or tissue homogenate to the incubation medium reduces the chemiluminescence. The time necessary to return to the levels present before the addition was considered to be the induction time. The induction time is directly proportional to the antioxidant capacity of the tissue and was compared to the induction time of Trolox. The results are reported as nmol of trolox per mg protein.

### *Catalase assay*

CAT activity was assayed by the method of Aebi [32] which is based on the disappearance of  $H_2O_2$  at 240 nm. Brain tissue was homogenized 1:10 (w/v) in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.6. One unit is defined as one  $\mu$ mol of hydrogen peroxide consumed per minute and the specific activity is reported as units per mg protein.

### *Superoxide dismutase assay*

The assay of SOD activity was carried out with the RANSOD kit (Randox, USA). Cerebral tissue was homogenized 1:10 (w/v) in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4. This method is based on the formation of red formazan from the reaction of 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (I.N.T.) and superoxide radical (produced in the incubation medium from xanthine oxidase reaction) which is assayed spectrophotometrically at 505 nm. The inhibition of the produced chromogen is proportional to the activity of the SOD present in the sample. A 50% inhibition is defined as one unit of SOD and specific activity is represented as units per mg protein.

### *Glutathione peroxidase assay*

GSH-Px activity was measured by the method of Wendel [33], except for the concentration of NADPH which was adjusted to 0.1 mM after previous tests performed in our

laboratory. Tissue was homogenized 1:10 (w/v) in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.6. *Tert*-butyl-hydroperoxide was used as substrate. NADPH disappearance was monitored with a spectrophotometer at 340 nm. One GSH-Px unit is defined as one  $\mu\text{mol}$  of NADPH consumed per minute and specific activity is represented as units per mg protein.

#### *Protein determination*

Protein was measured by the method of Lowry *et al.* [34] using bovine serum albumin as standard.

#### *Statistical analysis*

Data were analyzed by the Student's *t*-test or by one-way analysis of variance followed by the Duncan multiple range test when the F value was significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software.

## **RESULTS**

#### *Chemically induced phenylketonuria*

The effects of acute and chronic administration of Phe plus MePhe on TRAP and chemiluminescence were initially studied. Fig. 1 shows that TRAP was significantly decreased in brain homogenates from rats acutely [ $t(12)=4.95$ ;  $p<0.01$ ] and chronically treated [ $t(12)=4.19$ ;

$p < 0.01$ ] with Phe plus MePhe, as compared to control rats injected with saline. In contrast, chemiluminescence in brain homogenates from rats submitted to the acute [ $t(10)=3.87$ ;  $p < 0.01$ ] and chronic [ $t(10)=4.46$ ;  $p < 0.01$ ] PKU model was significantly increased compared to saline-treated animals (Fig. 2).

Furthermore, brain CAT activity (Fig. 3) was not altered in the acute PKU model [ $t(10)=0.33$ ;  $p > 0.05$ ] but was strongly reduced in chronically treated rats [ $t(10)=2.76$ ;  $p < 0.05$ ]. In turn, the activity of SOD in the homogenates was not affected by the acute [ $t(12)=0.52$ ;  $p > 0.05$ ] or chronic PKU model [ $t(12)=1.79$ ;  $p > 0.05$ ], as shown in Fig. 4. Finally, rats subjected to the acute [ $t(12)=5.43$ ;  $p < 0.01$ ] and chronic [ $t(12)=3.54$ ;  $p < 0.01$ ] treatments showed a significant decrease in brain GSH-Px activity (Fig. 5).

### *In vitro experiments*

Next, we tested the *in vitro* effect of Phe at concentrations resembling those found in PKU patients on TRAP and chemiluminescence (Table 1). We observed that Phe at concentrations of 1 mM and higher significantly diminished the antioxidant capacity (TRAP) of brain homogenates after 1 hour incubation [ $F(4,25)=3.60$ ;  $p < 0.05$ ] and stimulated chemiluminescence [ $F(4,25)=15.60$ ;  $p < 0.001$ ] in brain homogenates from 6-day-old rats. Moreover, we also observed a significantly inverse correlation between chemiluminescence and TRAP ( $r^2 = -0.79$ ;  $p < 0.01$ ), as illustrated in Fig. 6. These results strongly indicate that Phe increases the *in vitro* oxidative stress in brain from young rats.

To study the mechanisms by which Phe reduces the antioxidant capacity when administered to rats, we tested the effect of this amino acid on the activity of the principal enzymes responsible for the antioxidant defense in the brain homogenates from 6-day-old rats

(Table 2). CAT activity was strongly inhibited by Phe at all concentrations used [F(4,15)=90.36; p<0.001], whereas the activities of SOD [F(4,15)=1.26; p>0.05] and GSH-Px [F(4,30)=1.17; p>0.05] were not altered by the presence of Phe in the incubation medium.

We also studied the *in vitro* effect of a high concentration (5 mM) of MePhe, the inhibitor of phenylalanine hydroxylase activity used together with Phe to induce experimental PKU in rats, on these parameters. The results obtained for five rats (mean  $\pm$  SD) revealed that MePhe does not alter the antioxidant capacity [control:  $9.37 \pm 0.9$  nmol trolox/mg protein; MePhe  $8.79 \pm 0.68$  nmol trolox/mg protein; t(8)=1.33; p>0.05] or the chemiluminescence [control:  $2,816 \pm 223$  cps/mg protein; MePhe  $2,930 \pm 184$  cps/mg protein; t(8)=0.75; p>0.05], suggesting that MePhe by itself does not interfere with the oxidative stress parameters measured.

## DISCUSSION

Phenylketonuric patients are clinically characterized by marked neurological dysfunction which is usually related to tissue Phe levels. Therefore, early institution of a therapy based on a Phe-restricted diet was developed by Bickel and coworkers in 1953 and proved to effectively prevent the mental retardation of affected individuals [35,36,37]. These observations and the findings that Phe derivatives do not reach toxic levels in brain indicate that Phe is the main neurotoxic agent in PKU [1,38]. However, although neurologic symptoms predominate, the underlying mechanisms responsible for brain damage seem to be multiple and have not been completely elucidated. Furthermore, despite the apparently appropriate Phe-restricted diet, some patients present poor intellectual and school performance for reasons not yet understood, a fact

indicating that new therapeutic approaches should be devised to treat phenylketonuric patients [6,40,41,42].

Increased plasma malondialdehyde levels, as well as reduced blood selenium content and GSH-Px activity have been recently described in hyperphenylalaninemic patients [26,28]. However, no symptoms observed in these patients could be directly attributed to selenium deficiency [28]. Furthermore, the low activities of erythrocyte GSH-Px observed in many hyperphenylalaninemic patients were not altered by the selenium-supplemented formulas employed, suggesting the absence of a cause/effect relationship between plasma selenium levels and erythrocyte GSH-Px activity [26]. The same authors also observed that neurological disturbances were more frequent in these patients than in those with normal GSH-Px activity. Another interesting result is that ubiquinone-10, a substance with antioxidant action, is found at decreased concentrations in serum of PKU patients [29].

We decided to study a few oxidative stress parameters in brain of rats subjected to the widely used PKU model based on the administration of Phe plus MePhe, a phenylalanine hydroxylase inhibitor [43,44]. This Phe analogue has been tested by others on many neurochemical parameters and was considered a low-toxic agent compared to the other phenylalanine hydroxylase inhibitor, p-chlorophenylalanine [44].

In this study, we have demonstrated that chemiluminescence is significantly increased and TRAP is reduced in brain of hyperphenylalaninemic rats, indicating that chemical treatment with Phe plus MePhe induced oxidative stress in the animals. Since the *in vitro* experiments revealed that MePhe does not alter these parameters and that Phe increased chemiluminescence and reduced TRAP *in vitro* in brain homogenates, we presume that Phe induces free radical production and compromises the total antioxidant capacity of the nervous tissue. Moreover, the alteration of both parameters in a similar fashion is strongly indicative of oxidative stress since

this process is defined as the imbalance between free radical production and antioxidant defenses. At this point it should be emphasized the low cerebral antioxidant defenses [23], a fact that makes this tissue more vulnerable to increases of reactive oxygen species. In fact, an increasing number of pathological situations involving the CNS, such as neurodegenerative disorders, seizures, ischemia/reperfusion, and dementia, have been associated with oxidative stress [22].

The enzymes CAT, SOD and GSH-Px are considered to be the main enzymatic defenses of the brain against free radical production. We therefore tested the effects of the acute and chronic PKU models and also the *in vitro* effect of Phe on these enzyme activities. CAT activity was significantly inhibited by Phe both *in vitro* (up to 77 %) and *in vivo* in the chronic PKU model (55 %), but not in the acute one. Regarding the mechanisms by which Phe inhibits CAT activity, the *in vitro* findings probably indicate a direct interaction of the amino acid with the enzyme inhibiting its activity. On the other hand, apart from acting directly on the enzyme, speculatively Phe could also have an indirect effect in chronic *in vivo* studies at the transcription level, blocking CAT enzyme synthesis, or otherwise increasing its degradation.

SOD activity was not affected *in vivo* or *in vitro* by Phe, a fact indicating the specificity of the amino acid effect. On the other hand, Phe inhibited GSH-Px activity in the chronic and acute *in vivo* model of PKU, but not *in vitro*. These findings suggest an indirect action of Phe, not present in the homogenates, on this enzyme activity. Again, one possibility could be an action of Phe on the enzyme turnover affecting the synthesis and/or the degradation processes of GSH-Px. Considering the results of Phe action on CAT and on GSH-Px activities as a whole, we may presumed that Phe administration gives rise to a high concentration of hydrogen peroxide in the brain of the animals, secondarily leading to brain damage [45].

The present results strongly indicate that Phe stimulates oxidative stress in the brain of hyperphenylalaninemic rats and are in agreement with other findings observed in PKU patients.



These findings include increased products of lipid peroxidation found in plasma and reduced activity of GSH-Px in plasma and erythrocytes of PKU patients [26,28]. Furthermore, normal SOD activity was observed in these patients [46], which is also in line with our results.

The concentrations of Phe at which the effects were caused in this study were similar to those observed in PKU patients [1,39,42,47,48]. Even so, it is difficult to extrapolate our findings to the human condition. However, if the effects here detected also occur in the brain of phenylketonuric patients, it is possible that they may contribute, at least in part, to the acute and chronic neurological dysfunction characteristic of this disease. Therefore, the institution of antioxidant therapy in PKU may be of interest to test whether the affected patients will benefit from this therapy which could possibly be an adjuvant to the commonly used Phe-restricted diet.

**Acknowledgments** - This research was supported by grants from the Excellence Nuclei Program (PRONEX), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Brazilian National Research Council (CNPq).

#### REFERENCES

- [1] Scriver, C. R.; Kaufmann, S.; Eisensmith, R. C.; Woo, S. L. C. The hyperphenylalaninemias. In: Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D., eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 7th Edn. New York: McGraw-Hill, Inc.; 1995:1015-1075.
- [2] Hommes, F. A. On the mechanism of permanent brain dysfunction in hyperphenylalaninemia. *Med. Metab. Biol.* **46**:277-287; 1991.

- [3] Ushakova, G. A.; Gubkina, H. A.; Kachur, V. A.; Lepekhin, E. A. Effect of experimental hyperphenylalaninemia on the postnatal rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* **15**:29-36; 1997.
- [4] Guttler, F.; Lou, H. Phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. In: Fernandes, J.; Saudubray, M. M.; Tada, K., eds. *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*. Berlin: Springer-Verlag; 1990:161-174.
- [5] Zeman, G.; Pijackova, A.; Behulova, J.; Urge, O.; Saligova, D.; Hyanek, J. Intellectual and school performance in adolescents with phenylketonuria according to their dietary compliance. *Eur. J. Pediatr.* **155**(suppl. 1):56-58; 1996.
- [6] de Freitas, O.; Izumi, C.; Lara, M. G.; Greene, L. J. New approaches to the treatment of phenylketonuria. *Nutr. Rev.* **57**:65-70; 1999.
- [7] Shah, S. N.; Peterson, N. A.; McKean, C. M. Lipid composition of human cerebral white matter and myelin in phenylketonuria. *J. Neurochem.* **19**:2369-2376; 1972.
- [8] Bauman, M. L.; Kemper, T. L. Morphologic and histoanatomic observations of the brain in untreated phenylketonuria. *Acta Neuropathol.* **58**:55-63; 1982.
- [9] Binek, P. A.; Johnson, T. C.; Kelly, C. J. Effect of alpha-methylphenylalanine and phenylalanine on brain polyribosomes and protein synthesis. *J. Neurochem.* **36**:1476-1484; 1981.
- [10] Elsliger, M. A.; Thériault, G. R.; Gauthier, D. In vitro localization of the protein synthesis defect associated with experimental phenylketonuria. *Neurochem. Res.* **14**:81-84; 1989.
- [11] Paans, A. M.; Pruim, J.; Smit, G. P.; Visser, G.; Willemsen, A. T.; Ullrich, K. Neurotransmitter positron emission tomographic-studies in adults with phenylketonuria, a pilot study. *Eur. J. Pediatr.* **155**(Suppl. 1):S78-S81; 1996.

- [12] Möller, H. E.; Weglage, J.; Wiedermann, D.; Ullrich, K. Blood-brain barrier phenylalanine transport and individual vulnerability in phenylketonuria. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **18**:1184-1191; 1998.
- [13] Pietz, J.; Kreis, R.; Rupp, A.; Mayatepek, E.; Rating, D.; Boesch, C.; Bremer, H. J. Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *J. Clin. Invest.* **103**:1169-1178; 1999.
- [14] Hanley, W. B.; Lee, A. W.; Hanley, A. J.; Lehotay, D. C.; Austin, V. J.; Schoonheydt, W. E.; Platt, B. A.; Clarke, J. T. "Hypotyrosinemia" in phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* **69**:286-294; 2000.
- [15] Puglisi Allegra, S.; Cabib, S.; Pascucci, T.; Ventura, R.; Cali, F.; Romano, V. Dramatic brain aminergic deficit in a genetic mouse model of phenylketonuria. *Neuroreport* **11**:1361-1364; 2000.
- [16] Wyse, A. T. S.; Sarkis, J. J. F.; Cunha-Filho, J. S.; Teixeira, M. V.; Schetinger, M. R.; Wajner, M.; Wannmacher, C. M. D. Effect of phenylalanine and its metabolites on ATP-diphosphohydrolase activity in synaptosomes from rat cerebral cortex. *Neurochem. Res.* **19**:1175-1180; 1994.
- [17] Wyse, A. T. S.; Noriler, M. E.; Borges, L. F.; Floriano, P. J. Silva, C. G.; Wajner, M.; Wannmacher, C. M. D. Alanine prevents the decrease of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPase activity in experimental phenylketonuria. *Met. Brain Dis.* **14**:95-101; 1999.
- [18] Carreras, A. L.; Mattos-Dutra, A.; Meirelles, R.; Rocha, B. B.; Wannmacher, C. M. D.; Pessoa-Pureur, R. Phenylalanine inhibition of the phosphorylation of cytoskeletal proteins from cerebral cortex of young rats is prevented by alanine. *Eur. J. Clin. Invest.* **30**:536-542; 2000.

- [19] Rodrigues, N. R.; Wannmacher, C. M. D.; Dutra-Filho, C. S.; Pires, R. F.; Fagan, P. R.; Wajner, M. Effect of phenylalanine, p-chlorophenylalanine and  $\alpha$ -methylphenylalanine on glucose uptake *in vitro* by the brain of young rats. *Biochem Soc. Trans.* **18**:419-428; 1990.
- [20] Hasselbalch, S.; Knudsen, G. M.; Toft, P. B.; Høgh, P.; Tedeschi, E.; Holm, S.; Videbaek, C.; Henriksen, O.; Lou, H. C.; Paulson, O. B. Cerebral glucose metabolism is decreased in white matter changes in patients with phenylketonuria. *Pediatr. Res.* **40**:21-24; 1996.
- [21] Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. Oxygen radicals and nervous system. *Trend. Neurosci.* **8**:22-26; 1985.
- [22] Reznick, A. Z.; Packer, L. (). Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. In: Poli, G.; Albano, E.; Dianzani, M. U., eds. *Free Radicals: from Basic Science to Medicine*. Basel, Birkhäuser Verlag; 1993:425-437.
- [23] Halliwell, B. Free radicals, protein and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem. Soc. Trans.* **24**:1023-1027; 1996.
- [24] Rottoli, A.; Lista, G.; Zecchini, G.; Butté, C.; Longhi, R. Plasma selenium levels in treated phenylketonuric patients. *J. Inher. Metab. Dis.* **8(suppl. 2)**:127-128; 1985.
- [25] Darling, G.; Mathias, P.; O'Regan, M.; Naughten, E. Serum selenium levels in individuals on PKU diets. *J. Inher. Metab. Dis.* **15**:769-773; 1992.
- [26] Sierra, C.; Vilaseca, M.A.; Moyano, D.; Brandi, N.; Campistol, J.; Lambruschini, N.; Cambra, F. J.; Deulofeu, R.; Mira, A. Antioxidant status in hyperphenylalaninemia. *Clin. Chim. Acta* **276**:1-9; 1998.

- [27] Longhi, R.; Rottoli, A.; Vittorelli, A.; Zecchini, G.; Bonabitacola, T.; Bertassi, F.; Riva, E.; Giovannini, M. Trace elements nutriture in hyperphenylalaninemic patients: long-term follow up study. *Eur. J. Pediatr.* **146**(suppl. 1):32-37; 1987.
- [28] Wilke, B. C.; Vidailhet, M.; Favier, A.; Guillemin, C.; Ducros, V.; Arnaud, J.; Richard, M.J. Selenium, glutathione peroxidase (GSH-Px) and lipid peroxidation products before and after selenium supplementation. *Clin. Chim. Acta*, **207**:137-142; 1992.
- [29] Artuch, R.; Vilaseca, M. A.; Moreno, J.; Lambruschini, N.; Cambra, F. J.; Campistol, J. Decreased serum ubiquinone-10 concentrations in phenylketonuria. *Am. J. Clin. Nutr.* **70**:892-895; 1999.
- [30] Gonzalez-Flecha, B.; Llesuy, S.; Boveris, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Rad. Biol. Med.* **10**:93-100; 1991.
- [31] Lissi, E.; Pascual, C.; Del Castillo, M. D. Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Rad. Res. Comms.* **17**:299-311; 1992.
- [32] Aebi, H. Catalase *in vitro*. *Meth. Enzymol.* **105**:121-126; 1984.
- [33] Wendel, A. Glutathione Peroxidase. *Met. Enzymol.* **77**:325-332; 1981.
- [34] Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The J. Biol. Chem.* **193**:265-267; 1951.
- [35] Bieckel, H.; Gerrard, J.; Hickmans, E. M. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet* **2**:812-813; 1953.
- [36] Horner, F. A.; Streamer, C. W. Effect of phenylalanine-restricted diet on patients with phenylketonuria: clinical observations in three cases. *JAMA* **161**:1628-1630; 1956.
- [37] Centerwall, S. A.; Centerwall, W. R. The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two retarded children, and a scientist. *Pediatrics* **105**:89-103; 2000.

- [38] Sarkissian, C. N.; Scriver, C. R.; Mamer, O. A. 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**:242-249; 2000.
- [39] Weglage, J.; Möller, H. E.; Wiedermann, D.; Cipic Schmidt, S.; Zschocke, J.; Ullrich, K. In vivo NMR spectroscopy in patients with phenylketonuria: clinical significance of interindividual differences in brain phenylalanine concentrations. *J. Inherit. Metab. Dis.* **21**:81-82; 1998.
- [40] Pietz, J. Neurological aspects of adult phenylketonuria. *Curr. Opin. Neurol.* **11**:679-688; 1998.
- [41] Pietz, J.; Dunckelmann, R.; Rupp, A.; Rating, D.; Meinck, H. M.; Schmidt, H.; Bremer, H. J. Neurological outcome in adult patients with early-treated phenylketonuria. *Eur. J. Pediatr.* **157**:824-830; 1998.
- [42] Moats, R. A.; Koch, R.; Moseley, K.; Guldberg, P.; Guttler, F.; Boles, R. G.; Nelson, M. D. Jr. Brain phenylalanine concentration in the management of adults with phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* **23**:7-14; 2000.
- [43] Greengard, O; Yoss, M. S.; Delvalle, J. A.  $\alpha$ -Methylphenylalanine, a new inducer of chronic hyperphenylalaninemia in suckling rats. *Science* **192**:1007-1008; 1976.
- [44] Delvalle, J. A.; Dienel, G.; Greengard, O. Comparison of  $\alpha$ -methylphenylalanine and *p*-chlorophenylalanine as inducers of chronic hyperphenylalaninaemia in developing rats. *Biochem. J.* **170**:449-459; 1978.

- [46] Fisberg, R. M.; Da Silva Fernandes, M. E.; Fisberg, M.; Schmidt, B. J. Plasma zinc, copper, and erythrocyte superoxide dismutase in children with phenylketonuria. *Nutrition* **15**:449-52; 1999.
- [47] Novotny-Jr, E. J.; Avison, M. J.; Herschkowitz, N.; Petroff, O. A. C.; Prichard, J. W.; Seashore, M. R.; Rothman, D. L. *In vivo* measurement of phenylalanine in human brain by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Pediat. Res.* **37**:244-249; 1995.
- [48] Greengard, O.; Wolfe, J. Cerebral serotonin regulation by phenylalanine analogues and during hyperphenylalaninemia. *Biochem. Pharmacol.* **36**:965-970; 1987.

#### ABBREVIATIONS

ABAP – 2,2'-Azo-bis(2-amidinopropane)

CAT - catalase

GSH-Px – glutathione peroxidase

I.N.T. – 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride

MePhe -  $\alpha$ -methyl-DL-phenylalanine

NADPH - nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)

Phe - L-phenylalanine

PKU – Phenylketonuria

SOD – superoxide dismutase

TRAP – total reactivity antioxidant potential

## FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Effect of acute or chronic administration of L-phenylalanine plus  $\alpha$ -methyl-DL-phenylalanine on total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) in brain homogenates from 14-day-old rats. Results are mean  $\pm$  SD for seven independent experiments performed in duplicate. TRAP is calculated as nmol of trolox per mg protein. \*\*  $p < 0.01$  compared to control (Student t test).

Fig. 2. Effect of acute or chronic administration of L-phenylalanine plus  $\alpha$ -methyl-DL-phenylalanine on chemiluminescence in brain homogenates from 14-day-old rats. Results are mean  $\pm$  SD for six independent experiments performed in duplicate. \*\*  $p < 0.01$  compared to control (Student's t test).

Fig. 3. Effect of acute or chronic administration of L-phenylalanine plus  $\alpha$ -methyl-DL-phenylalanine on catalase activity in brain homogenates from 14-day-old rats. Results are mean  $\pm$  SD for six independent experiments performed in duplicate. One catalase unit is defined as one  $\mu$ mol of  $H_2O_2$  consumed per minute. \*  $p < 0.05$  compared to control (Student's t test).



Fig. 4. Effect of acute or chronic administration of L-phenylalanine plus  $\alpha$ -methyl-DL-phenylalanine on superoxide dismutase (SOD) activity in brain homogenates from 14-day-old rats. Results are mean  $\pm$  SD for seven independent experiments performed in duplicate. One SOD unit is defined as 50 % inhibition of red formazan formation. No significant differences from controls were detected by the Student's t test.

Fig. 5. Effect of acute or chronic administration of L-phenylalanine plus  $\alpha$ -methyl-DL-phenylalanine on glutathione peroxidase (GSH-Px) activity in brain homogenates from 14-day-old rats. Results are mean  $\pm$  SD for seven independent experiments performed in duplicate. One GSH-Px unit is defined as one  $\mu$ mol of NADPH consumed per minute. \*\*  $p < 0.01$  compared to control (Student's t test).

Fig. 6. Correlation between chemiluminescence and total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) in brain homogenates from 6-day-old rats. Data were taken from experiments on the *in vitro* effect of L-phenylalanine (Tab. 1). The asterisk indicates a statistically significant correlation.

Table 1. *In vitro* effect of L-phenylalanine on total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) and chemiluminescence in brain homogenates from 6-day-old rats

| Parameter                  | L-Phenylalanine concentration |             |               |               |                |
|----------------------------|-------------------------------|-------------|---------------|---------------|----------------|
|                            | 0 mM                          | 0.5 mM      | 1.0 mM        | 2.5 mM        | 5.0 mM         |
| TRAP<br>(n=6)              | 15.7 ± 0.9                    | 13.1 ± 2.0  | 8.9 ± 2.9 *   | 8.1 ± 2.9 *   | 6.7 ± 2.95 *   |
| Chemiluminescence<br>(n=6) | 2,234 ± 300                   | 2,454 ± 390 | 2,974 ± 436 * | 3,184 ± 328 * | 4,276 ± 302 ** |

Results are mean ± SD for experiments performed in duplicate. TRAP is calculated as nmol of trolox per mg protein and chemiluminescence is calculated as cps per mg protein. \* p<0.05, \*\* p<0.01 compared to control (Duncan multiple range test).

Table 2. *In vitro* effect of L-phenylalanine on antioxidant enzyme activities in brain homogenates from 6-day-old rats

| Enzyme Activities<br>(units/mg prot) | L-Phenylalanine concentration |             |             |             |             |
|--------------------------------------|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                                      | 0 mM                          | 0.5 mM      | 1.0 mM      | 2.5 mM      | 5.0 mM      |
| CAT<br>(n=4)                         | 7.0 ± 0.9                     | 1.6 ± 0.5 * | 2.0 ± 0.5 * | 3.1 ± 0.5 * | 1.7 ± 0.5 * |
| SOD<br>(n=4)                         | 84.2 ± 4.1                    | 84.3 ± 3.3  | 80.4 ± 5.9  | 82.0 ± 2.8  | 83.1 ± 1.6  |
| GSH-Px<br>(n=7)                      | 5.89 ± 0.78                   | 4.8 ± 1.4   | 5.4 ± 1.0   | 5.4 ± 1.3   | 4.7 ± 1.3   |

Results are mean ± SD for experiments performed in duplicate. One CAT unit is defined as one  $\mu\text{mol}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumed per minute. One SOD unit is defined as 50% inhibition of red formazan formation. One GSH-Px unit is defined as one  $\mu\text{mol}$  of NADPH consumed per minute. \*  $p < 0.01$  compared to control (Duncan multiple range test).

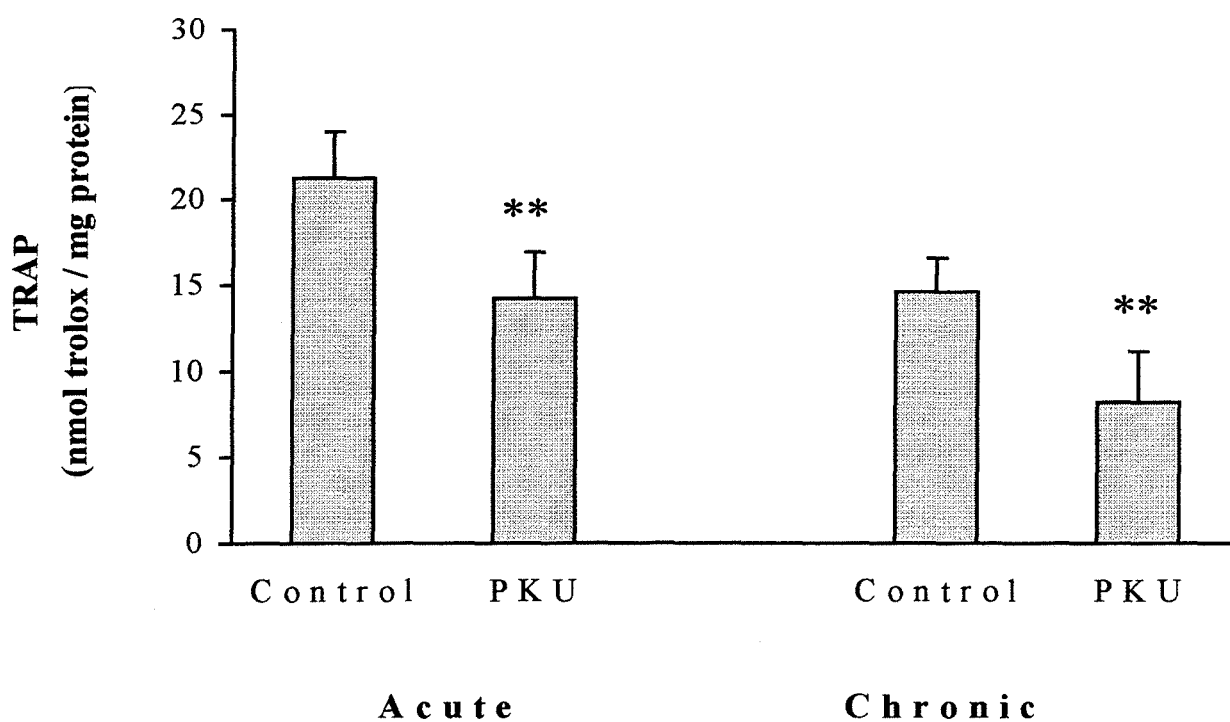


Fig. 1. Effect of acute or chronic administration of L-phenylalanine plus  $\alpha$ -methyl-DL-phenylalanine on total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) in brain homogenates from 14-day-old rats. Results are mean  $\pm$  SD for seven independent experiments performed in duplicate. TRAP is calculated as nmol of trolox per mg protein. \*\*  $p < 0.01$  compared to control (Student's t test).

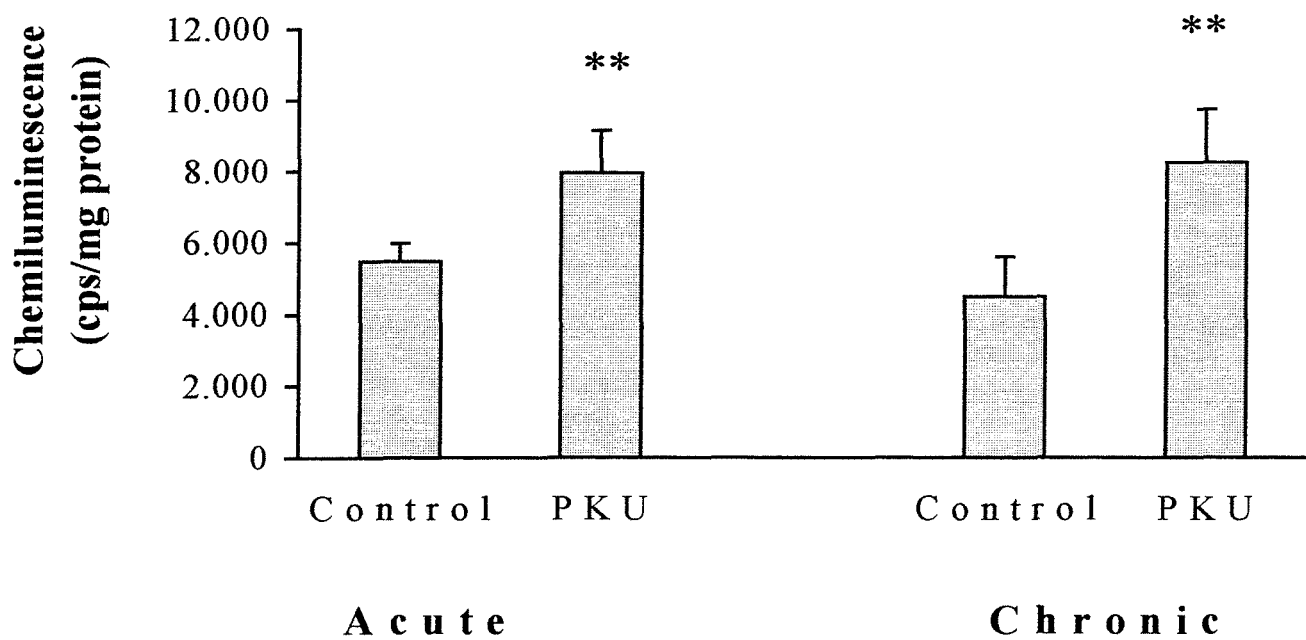


Fig. 2. Effect of acute or chronic administration of L-phenylalanine plus  $\alpha$ -methyl-DL-phenylalanine on chemiluminescence in brain homogenates from 14-day-old rats. Results are mean  $\pm$  SD for six independent experiments performed in duplicate. \*\*  $p < 0.01$  compared to control (Student's t test).

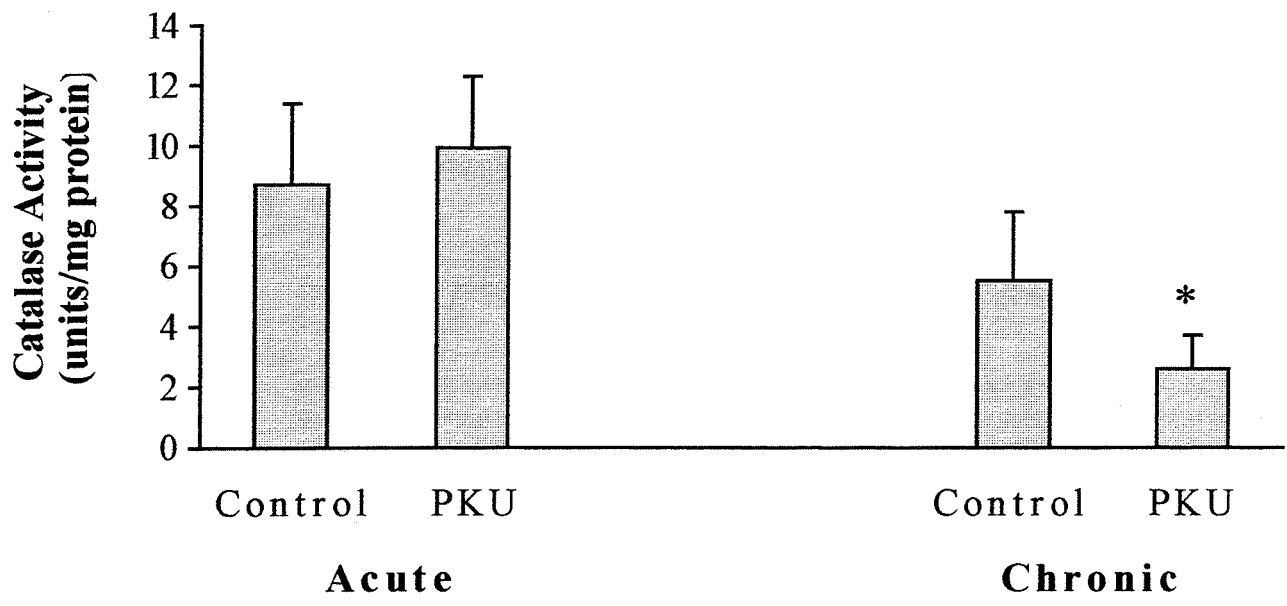


Fig. 3. Effect of acute or chronic administration of L-phenylalanine plus  $\alpha$ -methyl-DL-phenylalanine on catalase activity in brain homogenates from 14-day-old rats. Results are mean  $\pm$  SD for six independent experiments performed in duplicate. One catalase unit is defined as one  $\mu$ mol of  $H_2O_2$  consumed per minute. \*  $p < 0.05$  compared to control (Student's t test).

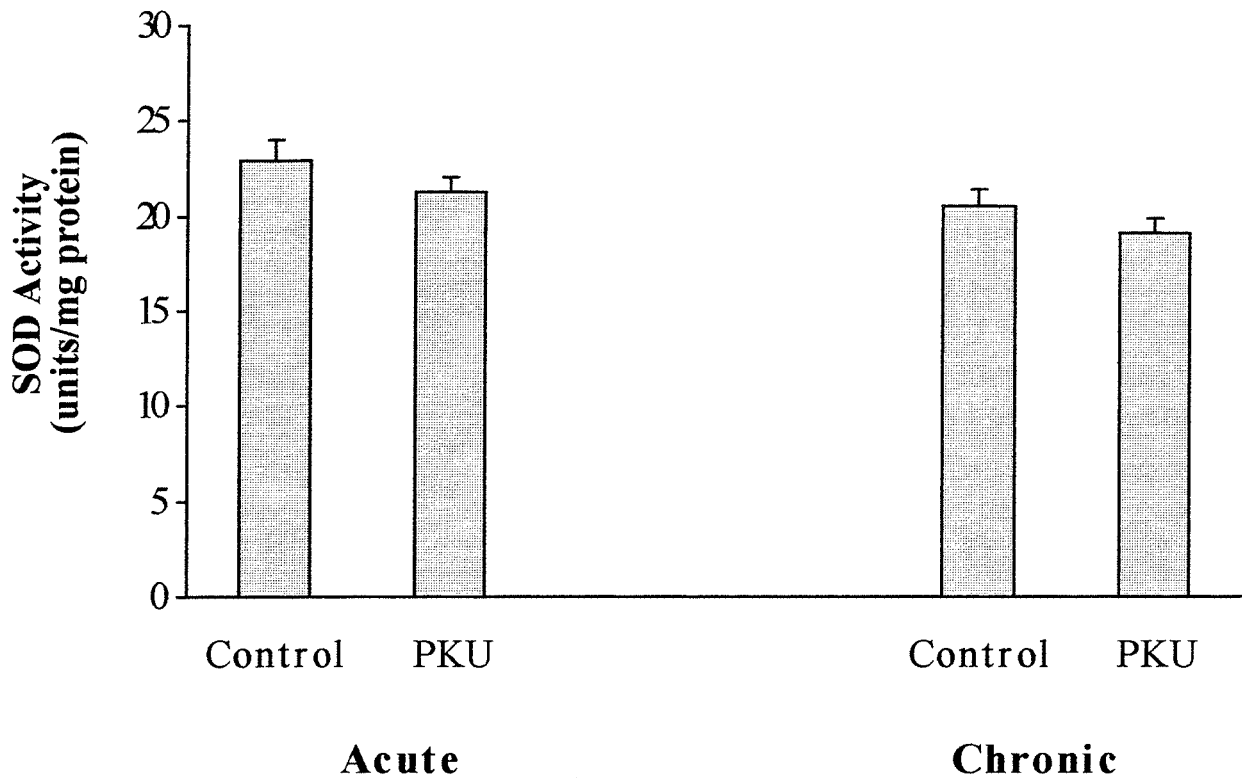


Fig. 4. Effect of acute or chronic administration of L-phenylalanine plus  $\alpha$ -methyl-DL-phenylalanine on superoxide dismutase (SOD) activity in brain homogenates from 14-day-old rats. Results are mean  $\pm$  SD for seven independent experiments performed in duplicate. One SOD unit is defined as 50 % inhibition of red formazan formation. No significant differences from controls were detected by the Student's t test.

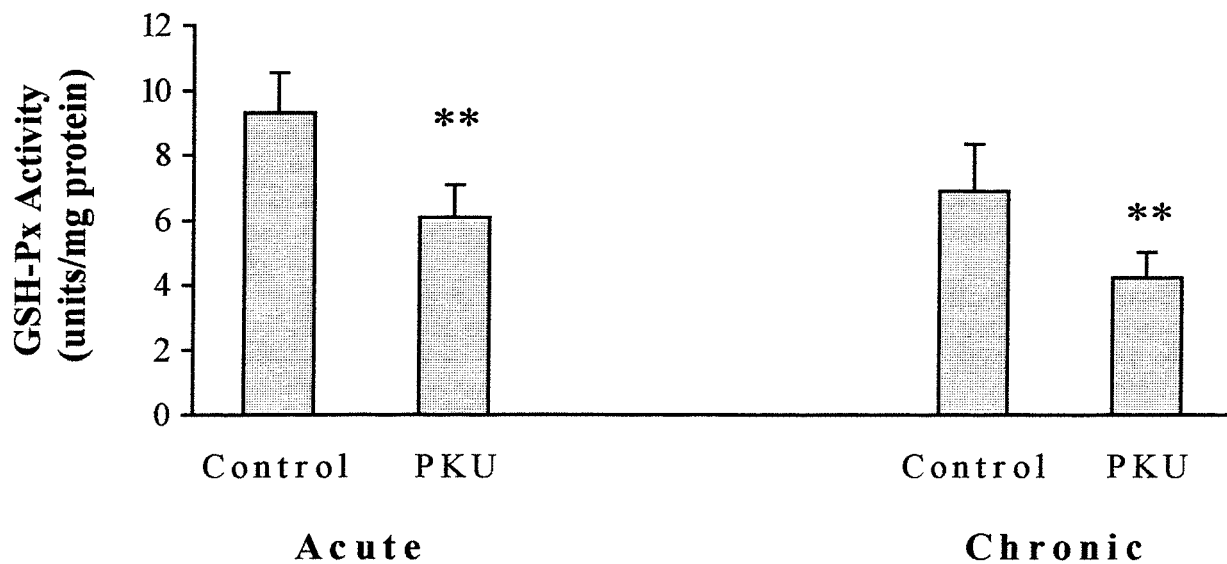


Fig. 5. Effect of acute or chronic administration of L-phenylalanine plus  $\alpha$ -methyl-DL-phenylalanine on glutathione peroxidase (GSH-Px) activity in brain homogenates from 14-day-old rats. Results are mean  $\pm$  SD for seven independent experiments performed in duplicate. One GSH-Px unit is defined as one  $\mu$ mol of NADPH consumed per minute. \*\*  $p < 0.01$  compared to control (Student's t test).



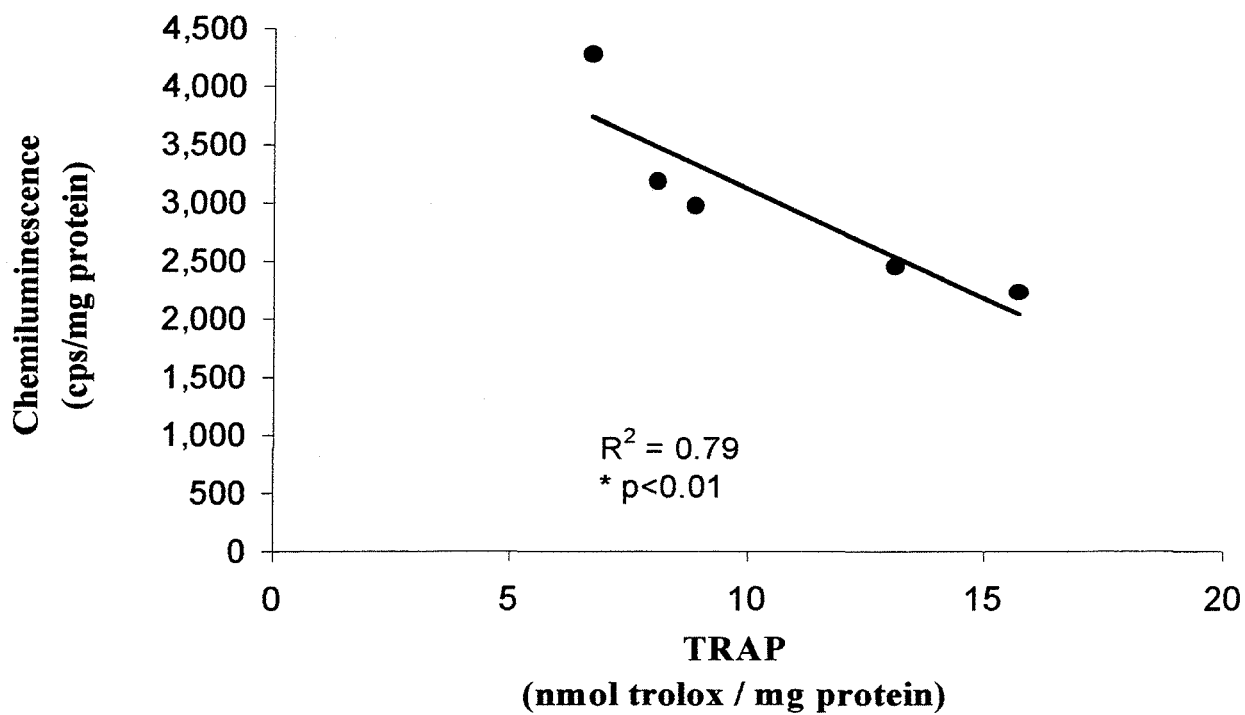


Fig. 6. Correlation between chemiluminescence and total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) in brain homogenates from 6-day-old rats. Data were taken from experiments on the *in vitro* effect of L-phenylalanine (Tab. 1). The asterisk indicates a statistically significant correlation.

## **IV. DISCUSSÃO**

Quase cinquenta anos após a publicação do primeiro tratamento proposto para fenilcetonúria, ainda não foi descoberto o tratamento ideal para melhorar a qualidade de vida destes pacientes, apesar dos muitos avanços já alcançados. Bickel e colaboradores (1954) desenvolveram um tratamento dietético, com restrição de fenilalanina, após a insistência da mãe de uma menina com fenilcetonúria diagnosticada por eles. A menina tinha 2 anos de idade, era gravemente retardada e apresentava outros sintomas clínicos. Em poucos meses de tratamento dietético restrito em fenilalanina, os sintomas clínicos e neurológicos começaram a melhorar. Após alguns testes, os pesquisadores concluíram que o tratamento dietético estava trazendo os resultados esperados, pois a menina apresentou um desenvolvimento mental significativo e obteve alta hospitalar.

Depois deste estudo, vários pesquisadores continuaram investigando os vários aspectos da doença a fim de aperfeiçoar o tratamento e entender melhor a sua fisiopatologia.

O presente trabalho consistiu na avaliação da capacidade da fenilalanina de estimular o estresse oxidativo *in vivo* e *in vitro*.

As elevações dos níveis sanguíneos de fenilalanina estão associadas ao agravamento da disfunção neurológica característica nos pacientes fenilcetonúricos. Vários pesquisadores já demonstraram que uma dieta restrita em fenilalanina previne a instalação dos sintomas neurológicos quando iniciada logo após o nascimento, indicando que não é a deficiência da enzima fenilalanina hidroxilase hepática, mas a hiperfenilalaninemia e/ou o acúmulo dos metabólitos da fenilalanina (fenilpiruvato, fenilactato e fenilacetato), que causam os danos cerebrais. Embora os pacientes fenilcetonúricos apresentem um padrão característico de disfunção neurológica, os mecanismos patogênicos responsáveis pelas alterações neurológicas não estão bem definidos.

O envolvimento dos radicais livres e do estresse oxidativo na fisiopatologia de várias situações que comprometem o sistema nervoso

central tem sido cada vez mais estudado. Um dos aspectos freqüentemente abordados são as mudanças patológicas que determinam a morte neuronal secundária, ou seja, de neurônios não afetados diretamente pelo insulto primário, mas sim por uma cascata de eventos provocada por este. Um dos primeiros fenômenos observados nesta seqüência de eventos é o processo de lipoperoxidação induzida por radicais livres de oxigênio (Carney et al., 1992).

Recentes publicações descreveram um aumento do malondialdeído plasmático e diminuição da atividade da GSH-Px plasmática e do conteúdo de selênio em pacientes hiperfenilalaninêmicos (Wilke et al. 1992; Sierra et al. 1998), o que sugere a participação do estresse oxidativo na fenilcetonúria. No entanto, Wilke e colaboradores (1992) declararam que não foram observados sintomas clínicos em pacientes fenilcetonúricos que pudessem ser diretamente atribuídos à deficiência de selênio. De fato, foi observada baixa atividade de GSH-Px eritrocitária em muitos pacientes hiperfenilalaninêmicos com uma dieta livre ou sob tratamento com suplemento de selênio (ambos os grupos com níveis plasmáticos normais de selênio) sugerindo uma falta de correlação entre níveis plasmáticos de selênio e atividade da GSH-Px (Sierra et al., 1998). Nestes pacientes, os distúrbios neurológicos foram observados mais freqüentemente do que naqueles com atividade normal da GSH-Px.

Inicialmente, o estresse oxidativo foi avaliado pela análise do potencial antioxidante total (TRAP) e pela medida de quimiluminescência em ratos submetidos a modelos agudo e crônico de fenilcetonúria. Foram também investigados os efeitos da L- fenilalanina *in vitro* sobre estes parâmetros.

A atividade da CAT foi determinada pelo método de Aebi (1984). Este método baseia-se na medida da velocidade do consumo do peróxido de hidrogênio das amostras. A taxa de decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, determinada em espectrofotômetro, é diretamente proporcional à atividade da catalase.

A toxicidade do  $H_2O_2$  nos sistemas biológicos é bastante conhecida, tendo a CAT a função fisiológica de não permitir o aumento da concentração do  $H_2O_2$ . Em locais onde a CAT está em baixas concentrações, como no cérebro, o controle intracelular da quantidade de  $H_2O_2$  presente é particularmente importante na oxidação celular (Boveris & Chance, 1973).

A segunda enzima avaliada, a SOD teve sua atividade determinada pelo kit RANDOX. Neste método o  $O_2^{\cdot-}$  é gerado a partir do sistema xantina/xantina oxidase, que reage com o INT [cloreto de 2-4 iodofenil-3- (4 nitrofenil)-5-fenil tetrazólio] para formar o corante vermelho de formazan (Figura IV. 1). A atividade da enzima é calculada a partir do grau de inibição da formação deste corante.

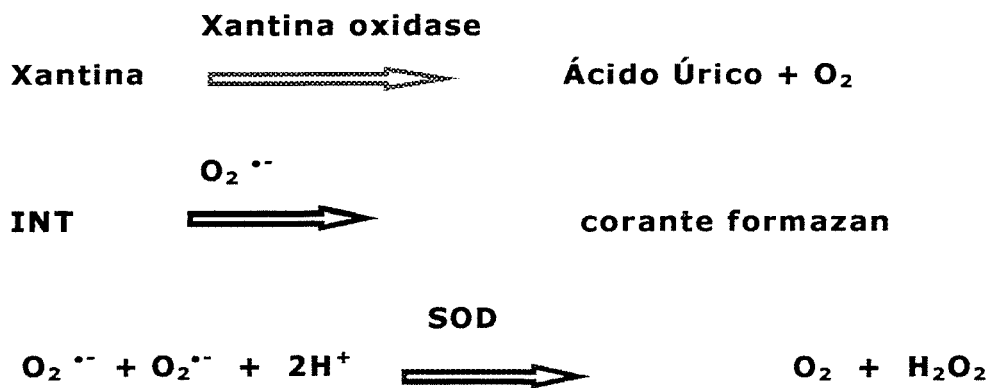


Figura IV. 1 – Reação de dismutação do superóxido formado pelo sistema xantina/xantina oxidase.

A terceira enzima estudada foi a GSH-Px, através do método de Wendel (1981), que determina a atividade da GSH-Px através da medida da taxa de oxidação do NADPH, na presença de GSH e GR (Figura IV. 2).

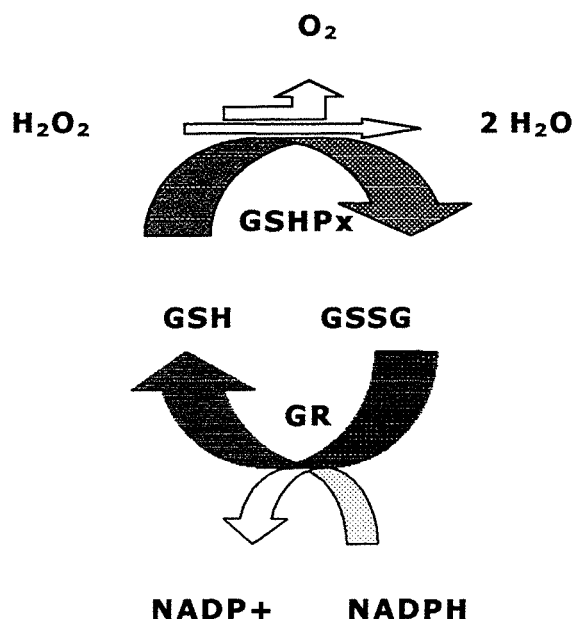


Figura IV. 2: Reação do peróxido de hidrogênio catalisada pela GSH-Px e redução de GSSG usando NADPH como coenzima (adaptado de Magistretti, 1999).

Neste estudo, nós demonstramos que a L-fenilalanina aumenta a quimiluminescência e reduz o TRAP *in vivo* e *in vitro* em homogeneizado de cérebro de ratos, sugerindo que o aminoácido induz a produção de radicais livres e compromete a capacidade antioxidante total do tecido nervoso. A alteração de ambos os parâmetros é um importante indicativo de estresse oxidativo, pois este é definido como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes. Nós aplicamos o modelo animal de fenilcetonúria, amplamente utilizado, baseado na administração de L-fenilalanina mais  $\alpha$ -metil-DL-fenilalanina, um inibidor da fenilalanina hidroxilase (Greengard et al., 1976; Delvalle et al., 1978; Wyse et al., 1994; Wyse et al., 1999). Este análogo da fenilalanina foi testado em muitos parâmetros neuroquímicos e considerado um agente não tóxico (Delvalle et al., 1978). Nossos resultados estão de acordo com estas constatações, visto que nós observamos que a  $\alpha$ -metil-DL-fenilalanina não modificou a quimiluminescência e o TRAP *in vitro* na concentração de 5 mM. Portanto, as alterações verificadas nos parâmetros de estresse oxidativo

no modelo animal de fenilcetonúria são, provavelmente, devidas ao aumento da concentração de L-fenilalanina no tecido nervoso.

A atividade da CAT foi significativamente inibida pela L-fenilalanina *in vitro* e *in vivo* no modelo crônico de fenilcetonúria, porém no modelo agudo de fenilcetonúria não constatamos inibição desta enzima. A L-fenilalanina também inibiu a atividade da GSH-Px *in vivo*, mas a atividade da SOD não sofreu inibição.

Conforme nossos resultados, podemos supor que houve uma alta produção de  $H_2O_2$ . O  $H_2O_2$  é produzido na mitocôndria e, cerca de 71% dessa espécie ativa de oxigênio, em condições normais, é metabolizada pela CAT, enquanto que 19% são metabolizadas pela GSH-Px juntamente com 4% do  $HO^*$  formado. Dessa forma sugere-se que, com a inibição da CAT, aumente também a formação do  $HO^*$ , contribuindo ainda mais para os danos celulares (Gsell et al., 1995).

A inibição da atividade da CAT pela L-fenilalanina pode ser devida a uma interação direta do aminoácido com a enzima já que a L-fenilalanina produz uma rápida e potente inibição da CAT *in vitro*. Por outro lado, uma ação indireta da L-fenilalanina pode ocorrer, especialmente nos estudos *in vivo*, como por exemplo a inibição da síntese da enzima, já que apenas no modelo crônico houve diminuição da atividade da CAT. Trabalhos anteriores mostraram que a L-fenilalanina compromete o metabolismo energético cerebral (Rodrigues et al., 1990), o que pode levar à excitotoxicidade e ao aumento do cálcio ( $Ca^{2+}$ ) intracelular. A óxido nítrico sintase é estimulada por  $Ca^{2+}$  produzindo  $NO^*$ , um conhecido inibidor da CAT (Brown, 1995; Dawson & Dawson, 1996a ; Dawson & Dawson, 1996b).

O  $NO^*$  inibe a atividade da CAT, provavelmente por competição com o  $H_2O_2$  (Brown, 1995).

A atividade da GSH-Px mostrou-se reduzida *in vivo* mas não foi inibida *in vitro* pela L-fenilalanina, o que indica um efeito indireto do aminoácido na atividade da enzima, dependendo de um fator não

efetivamente presente no homogeneizado de cérebro utilizado para os experimentos *in vitro*. Uma possibilidade pode ser a ação da L-fenilalanina no *turnover* da enzima afetando os processos de síntese e/ou degradação da GSH-Px. Também podemos supor que os metabólitos da L-fenilalanina produzidos apenas *in vivo* possam ser responsáveis por esta inibição. A produção de NO<sup>•</sup> aumentada em situações de déficit energético e excitotoxicidade já citadas, também pode ser responsável por esta inibição.

O NO<sup>•</sup> reage com outros radicais tais como O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e radicais derivados de lipídios, formando o ONOO<sup>•</sup>. Entre os alvos biológicos que podem reagir diretamente com o ONOO<sup>•</sup> estão as proteínas que contêm heme, tais como a hemoglobina, a CAT, a mieloperoxidase e a GSH-Px (Squadrito & Pryor, 1998).

Tem sido demonstrado que os níveis séricos de fenilalanina podem alcançar de 1 a 3 mM em pacientes fenilcetonúricos (Novotny Jr, 1995) e nos modelos animais de fenilcetonúria (Greengard & Wolfe, 1987). Medidas de ressonância nuclear magnética *in vivo*, em pacientes fenilcetonúricos, demonstraram que o conteúdo de fenilalanina cerebral pode chegar a 0,8 mmol/g (Novotny Jr, 1995). Portanto, as concentrações de L-fenilalanina em que os efeitos foram observados neste estudo são semelhantes às aquelas observadas nos pacientes fenilcetonúricos.

Estudos anteriores relataram parâmetros aumentados de lipoperoxidação no plasma e reduzida atividade da GSH-Px em plasma e eritrócitos de pacientes com fenilcetonúria (Wilke et al., 1992). Nossos resultados indicam que a L-fenilalanina estimula o estresse oxidativo no cérebro de ratos *in vivo* e *in vitro*. Nós não podemos excluir que os metabólitos da fenilalanina também possam ser responsáveis pelos efeitos encontrados, o que será investigado posteriormente.



Se estes efeitos também ocorrem em pacientes fenilcetonúricos, é possível que eles estejam envolvidos nos mecanismos responsáveis pelo dano cerebral desta doença. Portanto, poderá ser interessante testar uma terapia antioxidante na fenilcetonúria.

## **V. CONCLUSÕES**

Este trabalho possibilitou, as seguintes conclusões:

## 1 - ***In vivo*** – Modelo animal de fenilcetonúria

### 1.1 – Modelo Agudo

Em animais submetidos ao modelo agudo de fenilcetonúria verificou-se o aumento da quimiluminescência, a redução do TRAP e da atividade da GSH-Px em cérebro de ratos identificando um aumento do estresse oxidativo. As atividades das enzimas CAT e SOD não apresentaram alterações.

### 1.2 – Modelo Crônico

Em animais submetidos ao modelo crônico de fenilcetonúria observou-se o aumento da quimiluminescência, redução do TRAP e das atividades das enzimas CAT e GSH-Px também identificando um aumento do estresse oxidativo. A atividade da enzima SOD não demonstrou alteração.

## 2 - ***In vitro***

A L-fenilalanina aumentou a quimiluminescência, reduziu o TRAP e inibiu significativamente a atividade da enzima CAT, mas não alterou as atividades das enzimas GSH-Px e SOD.

Os resultados indicam que o estresse oxidativo pode estar envolvido na neuropatologia da fenilcetonúria. No entanto, posteriores investigações são necessárias para confirmar e estender nossas constatações à condição humana e também determinar se uma terapia antioxidante pode beneficiar estes pacientes.

## **VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALVORD, E. C.; STEVENSON, L. D.; VOGEL, F. S. ; ENGLE, R. L. Neuropathological findings in phenylpyruvic oligophrenia (phenylketonuria). **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** **9**, p. 298-310, 1950.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Meth. Enzymol.** **105**, p. 121-126, 1984.

BAUMAN, M. L. & KEMPER, T. L. Morphologic and histoanatomic observations of the brain in untrated human phenylketonuria. **Acta Neuropath.** **58**, p. 55-63, 1982.

BERGER, R.; SPRINGER, J.; HOMMES, F. A. Brain protein and myelin metabolism in young hyperphenylalaninemic rats. **Mol. Cell Biol.** **26**, p. 31-36, 1980.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVÁ, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sci.** **65**, p. 1865-1874, 1999.

BICKEL, H.; GERRARD, J.; HICKMANS, E. M. The influence of phenylalanine intake on the chemistry and behavior of a phenylketonuric child. **Acta Paediatr.** **43**, p. 64-77, 1954.

BONDY, S. Evaluation of free radical-initiated oxidant events within the nervous system. In PEREZ-POLO, J. R. (Editor) **Paradigms Neural Injury**: Academic Press, San Diego, p. 243-259, 1996.

BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. **Medicina (Buenos Aires) 58**, p. 350-356, 1998.

BOVERIS, A. & CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **Biochem. J. 134**, p. 707-716, 1973.

BROWN, G. C. Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. **Eur. J. Biochem. 232**, p. 188-191, 1995.

CARNEY, J. M.; TATSUNO, R. A.; FLOYD, R. A. The role of oxygen radicals in ischemic brain damage: free radicals production, protein oxidation and tissue dysfunction. In KREIGLSTEIN, H.; OBERPICHLER-SCHWENK, H. **Pharmacology of Cerebral Ischemia**: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, p. 321-331, 1992.

CASSARINO, D. S. & BENNET JR., J. P. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. **Brain Res. Rev. 29**, p. 1-25, 1999.

CHANCE, A.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.** **59**, p. 527-605, 1979.

CLARK, J. B.; BATES, T. E.; CULLINGFORD, T.; LAND, J. M. Development of enzymes of energy metabolism in neonatal mammalian brain. **Dev. Neurosci.** **15**, p. 174-180, 1993.

DELANTY, N. & DICHTER, M. A. Oxidative injury in the nervous system. **Acta Neurol. Scand.** **98**, p. 145-153, 1998.

DELVALLE, J. A.; DIENEL, G.; GREENGARD, O. Comparison of  $\alpha$ -methylphenylalanine and *p*-chlorophenylalanine as inducers of chronic hyperphenylalaninaemia in developing rats. **Biochem. J.** **170**, p. 449-459, 1978.

DAWSON V. L. & DAWSON, T. M. Nitric oxide in neuronal degeneration. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **211**, suppl. **1**, p. 33-40, 1996a.

DAWSON V. L. & DAWSON, T. M. Nitric oxide neurotoxicity. **J. Chem. Neuroanat.** **10**, suppl. **3-4**, p. 179-190, 1996b.

ESTROV, Y.; SCAGLIA, F.; BODAMER, O. A. F. Psychiatric symptoms of inherited metabolic disease. **J. Inher. Metab. Dis.** **23**, p. 2-6, 2000.

FLOYD, R. A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. **FASEB J.** 4, P. 2587-2597, 1990.

FOIS, A.; ROSEMBERG, C.; GIBB, F. A. The electroencephalogram in phenylpyruvic oligophrenia. **Electroenceph. Clin. Neurophysiol.** 7, p. 568-569, 1955.

FRIDOVICH, I. Superoxido dismutases. **Ann. Rev. Biochem.** 44, 147-157, 1975.

GIUGLIANI, R.; COSTA, J. C.; DUTRA-FILHO, C. S.; DUTRA, J. C.; PEREIRA, M. L. S. Et al. Successful therapy of hyperphenylalaninemia due to defective tetrahydrobiopterin metabolism in two siblings. **Rev. Bras. Genet.** 9, p. 685-692, 1986.

GLICK, S. & GREENGARD, O. Exaggerated cerebral lateralization in rats after early postnatal hyperphenylalaninemia. **Brain Res.** 202, p. 243-248, 1980.

GREENGARD, O. & WOLFE, J. Cerebral Serotonin regulation by phenylalanine analogues and during hyperphenylalaninemia. **Biochem. Pharmacol.** 36, p. 965-970, 1987.

GREENGARD, O.; YOSS, M. S.; DELVALLE, J. A.  $\alpha$ -Methylphenylalanine, a new inducer of chronic hyperphenylalaninemia in suckling rats. **Science** 192, p. 1007-1008, 1976.



GSELL, W.; CONRAD, R.; HICKETHIER, M.; SOFIC, E.; FRÖLICH, L.; WICHART, I.; JELLINGER, K.; MOLL, G.; RANSMAYR, G.; BECKMANN, H.; RIEDERER, P. Decreased catalase activity but unchanged superoxide dismutase activity in brains of patients with dementia of Alzheimer type. **J. Neurochem.** **64**, p. 1216-1223, 1995.

GUTHRIE, R. The introduction of newborn screening for phenylketonuria. **Eur. J. Pediatr.** **155**, supl. **1**, p. 4-5, 1996.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**: Oxford University Press, Oxford, 3<sup>a</sup> ed., 1999.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J. Neurochem.** **59**, p. 1.609-1.623, 1992.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Meth. Enzymol.** **186**, p. 1-63, 1990.

HALLIWELL, B. Tell me about free radicals, doctor: a review. **Royal Soc. Med.** **82**, p. 747-752, 1989.

HALLIWELL, B. Drug antioxidant effects. **Drugs** **42**, p. 569-605, 1991.

- HOGAN, R. N. & COLEMAN, P. D. Experimental hyperphenylalaninemia: dendritic alterations in motor cortex of rat. **Exp. Neurol.** **74**, p. 218-233, 1981.
- HOMMES, F. A. On the mechanism of permanent brain dysfunction in hyperphenylalaninemia. **Biochem. Med. Metab. Biol.** **46**, p. 277-287, 1991.
- HOMMES, F. A. The role of blood-brain barrier in the aetiology of permanent brain dysfunction in hyperphenylalaninemia. **J. Inher. Metab. Dis.** **12**, p. 41-46, 1989.
- HOMMES, F. A.; ELLER, R. G.; TAYLOR, E. H. The effects of phenylalanine on myelin metabolism in adolescent rats. In: COCKBURN, F.; GITZELMANN, R. (Editores). **Inborn Errors of Metabolism in Human**: MTP Press, Lancaster, p.193-199, 1982.
- HUETHER, G.; NEUHOFF, V.; KAUS, R. Brain development in experimental hyperphenylalaninemia: disturbed proliferation and reduced cell numbers in the cerebellum. **Neuropediatrics** **14**, p. 12-19, 1983.
- JERVIS, G. A. Studies on phenylpyruvic oligophrenia. The position of the metabolic error. **J. Biol. Chem.** **169**, p. 651-656, 1947.

KATZ, I.; LLOYD, T.; KAUFMAN, S. Studies on the phenylalanine and tyrosine hydroxylation by rat brain tyrosine hydroxylase. **Biochem. Biophys. Acta.** **445**, p. 567-578, 1976

KUHAR, M. J.; COUCEYRO, P. R.; LAMBERT, P. D. Catecholamines. In SIEGEL, G. J.; AGRANOFF, B. W.; ALBERS, R. W.; FISCHER, S. K.; UHLER, M. D. **Basic Neurochemistry**: Lippincot-Raven, New York, p. 243-261, 1999.

LONGHI, R.; ROTTOLI, A.; VITTORELLI, A.; ZECCHINI, G.; BONABITACOLA, T.; BERTASSI, F.; RIVA, E.; GIOVANNINNI, M. Trace elements nutriture in hyperphenylalaninemic patients: long-term follow up study. **Eur. J. Pediatr.** **146**, suppl. **1**, p. 32-37, 1987

LOWRY O. H.; ROSEBROUGH N. J.; FARR A. L.; RANDALL R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** **193**, p. 265-267, 1951.

MACHLIN, L. J. & BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB J.** **1**, p. 441-445, 1987.

MAIORINO, M.; GREGOLIN, C.; URSINI, F. Phospholipid hidroperoxide glutathione peroxidase. **Meth. Enzymol.** **186**, p. 448-457, 1990.

MARKS, D. B.; MARKS, A. D.; SMITH, C. M. **Basic Medical Biochemistry**: Williams & Wilkins, Baltimore, p. 336, 1996.

MEERSON, F. Z.; KAGAN, V. E.; KOSLOV, Y. P.; BELKINA, L. M.; ARKIPENKO, Y. V. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemia damage and the antioxidant protection of the heart. **Basic Res. Cardiol.** **77**, p. 465-485, 1982.

MILLS, G. C. Glutathione peroxidase and the destruction of hydrogen peroxide in animal tissues. **Arch. Biochem. Biophys.** **86**, p. 1-5, 1960.

MOYANO, D.; VILASECA, M. A.; PINEDA, M.; CAMPISTOL, J.; VERNET, A.; PÓO, P.; ARTUCH, R.; SIERRA, C. Tocopherol in inborn errors intermediary metabolism. **Clin. Chim. Acta** **263**, 147-155, 1997.

MÖLLER, H. E.; VERMATHEN, P.; ULLRICH, K.; WEGLAGE, J.; KOCH, H. G.; PETERS, P. E. *In vivo* NMR spectroscopy in patients with phenylketonuria: changes of cerebral phenylalanine levels under dietary treatment. **Neuropediatrics** **26**, p. 199-202, 1995.

MOATS, R. A ; KOCH, R.; MOSELEY, K.; GULDBERG, P.; GUTTLER, F.; BOLES, R. G.; NELSON-JR, M. D. Brain phenylalanine concentration in the management of adults with phenylketonuria. **J. Inher. Metab. Dis.** **23**, p. 7-14, 2000.

NIGAN, M. P. & LABOR, D. R. The effect of hyperphenylalaninemia on size and density of synapses in rat neocortex. **Brain Res.** **179**, p. 195-198, 1979.

NOVOTNY-JR, E. J.; AVISON, M. J.; HERSCHKOWITZ, N.; PETROFF, O. A. C.; PRICHARD, J. W.; SEASHORE, M. R.; ROTHMAN, D. L. *In vivo* measurement of phenylalanine in human brain by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Pediat. Res.** **37**, p. 244-249, 1995.

NYHAN, W. L. **Abnormalities in Amino Acid Metabolism in Clinical Medicine**: Appleton-Century-Crofts, Norwalk, p.129-148, 1984.

NYHAN, W. L. Phenylketonuria. In BERGSMA, D. (Editores) **Birth Defects Compendium**: 2<sup>a</sup> ed., Alan R. Liss. Inc., New York, p. 866-867, 1979.

PAINE, R. S. The variability and manifestations of untreated patients with phenylketonuria (phenylpyruvic aciduria). **Pediatrics** **20**, p. 290-302, 1957.

PIETZ, J.; SCHMIDT, E.; MATTHIS, P.; KOBIALKA, B.; SONNEVILLE, L. EEGs in phenylketonuria, I: Follow-up to adulthood; II: Short-term diet-related changes in EEGs and cognitive function. **Develop. Med. Child. Neurol.** **35**, p. 54-64, 1993.

PIETZ, J.; KREIS, R.; BOESCH, C.; PENZIEN, J. RATING, D.; HERSCHKOWITZ, N. The dynamics of brain concentrations of phenylalanine and its clinical significance in patients with

phenylketonuria determined by *in vivo* H magnetic resonance spectroscopy. **Pediatr. Res.** **38**, p. 657 - 663, 1995.

PRYOR, W. A. The free radical theory of aging revisited: A critique and a suggested disease specific theory. In: Warner, H. R. et al. (Editores). **Modern Biological Theories of Aging**: Raven Press, New York, 89-112, 1970.

RESNICK, A. Z. & PARKER, L. Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. In POLI, G; ALBANO, E.; DIANZANI, M. U. (Editores). **Free Radicals: from basic Science to Medicine**: Basel, Birkhäuser Verlag, p. 425-437, 1993.

RODRIGUES, N. R.; WANNMACHER, C. M. D.; DUTRA-FILHO, C. S.; PIRES, R. F.; FAGAN, P. R.; WAJNER, M. Effect of phenylalanine, p-chlorophenylalanine and  $\alpha$ -methylphenylalanine on glucose uptake *in vitro* by the brain of young rats. **Biochem. Soc. Trans.** **18**, p. 419-428, 1990.

SHAH, S.; PETERSON, N. A.; Mc KEAN, C. M. Lipid composition of human cerebral white matter and myelin in phenylketonuria. **J. Neurochem.** **19**, p. 2369-2376, 1972.

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

SCRIVER, C. R. & CLOW, C. L. Phenylketonuria: Epitome of human biochemical genetics. **New Engl. J. Med.** **303**, p. 1336-1342, 1980.

SCRIVER, C. R.; KAUFMAN, S.; WOO, S. L. C. The hyperphenylalaninemias. In SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SLY, W. S.; VALLE, D. (Editores). **The Metabolic Basis of Inherited Disease**: McGraw-Hill, New York, 6<sup>a</sup> ed., p. 495-546, 1989.

SCRIVER, C. R.; KAUFMAN, S.; EISENSMITH, R. C.; WOO, S. L. C. The hyperphenylalaninemias. In SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SLY, W. S.; VALLE, D. (Editores). **The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease**: McGraw-Hill, New York, 7<sup>a</sup> ed., p. 1015-1075, 1995.

SIERRA, C.; VILASECA, M. A.; MOYANO, D.; BRANDI, N.; CAMPISTOL, J.; LAMBRUSCHINI, N.; CAMBRA, F. J.; DEULOFEU, R.; MIRA, A. Antioxidant status in hyperphenylalaninemia. **Clin. Chim. Acta** **276**, p. 1-9, 1998.

SQUADRITO, G. L. & PRYOR, W. A. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. **Free Rad. Biol. Med.** **25**, p. 392-403, 1998

SOUTHORN, P. A. & POWIS, G. Free radicals in medicine I. Chemical nature and biological reactions. **Mayo Clin. Proc.** **63**, p. 381-389, 1988.

TAYLOR, E. H.; HOMMES, F. A. Effect of experimental hyperphenylalaninemia on myelin metabolism at later stages of brain development. **Int. J. Neurosc.** **20**, p. 217-228, 1983.

TOURIAN, A.; SIDBURY, J. B. Phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. In STANBURY, J. B. ; WYNGAARDEN, J. B.; FREDRICKSON, D. S. **The Metabolic Basis of Inherited Disease**: McGraw-Hill, New York, 5<sup>a</sup> ed., p. 270-286, 1983.

UDENFRIEND, S. & COOPER, J. R. The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. **J. Biol. Chem.** **194**, p. 503-511, 1952.

ULLRICH, K.; MÖLLER, H.; WEGLAGE, J.; SCHUIERER, G.; BICK, U.; LUDOLPH, A.; HAHN-ULLRICH, H.; FÜNDERS, B.; KOCH, H. G. White matter abnormalities in phenylketonuria: results of magnetic resonance measurements. **Acta Paediatr.** **407 (Supl)**, p. 78-82, 1994.

VILLASANA, D.; BUTLER, I. J.; WILLIAMS, J. C.; ROONGTA, S. M. Neurological deterioration in adult phenylketonuria. **J. Inher. Metab. Dis.** **12**, p. 451-457, 1989.

WANNMACHER, C. M. D. **Estudos Experimentais sobre a Patogênese de Erros Inatos do Metabolismo**. Tese apresentada para a obtenção de grau de Doutor ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica. UFRGS, Porto Alegre, RS, 1995.



WANNMACHER, C. M. D.; WAJNER, M.; GIUGLIANI, R.; GIUGLIANI, E. R. J.; COSTA, M. G. Et al. Detection of metabolic disorders among high risk patients. **Rev. Bras. Genet.** **5**, p. 187-194, 1982.

WEBSTER, N. R. & NUNN, J. F. Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. **Br. J. Anaesth.** **60**, p.98-108, 1988

WEGLAGE, J.; OBERWITTLER, C.; MARQUARDT, T.; SCHELLSCHEIDT, J.; TEEFFELEN-HEITHOFF, A. V.; KOCH, G.; GERDING, H. Neurological deterioration in adult phenylketonuria. **J. Inher. Metab. Dis.** **23**, p. 83-84, 2000.

WENDEL, A. Glutathione Peroxidase. **Meth. Enzymol.** **77**, p. 325-332, 1981.

WILKE, B. C.; VIDAILHET, M.; FAVIER, A.; GUILLEMIN, C.; DUCROS, V.; ARNAUD, J.; RICHARD, M.J. Selenium, glutathione peroxidase (GSH-Px) and lipid peroxidation products before and after selenium supplementation. **Clin. Chim. Acta**, **207**, p. 137-142, 1992.

WOMACK, M. & ROSE, W. C. Feeding experiments with mixtures of highly purified amino acids. The relation of phenylalanine and tyrosine to growth. **J. Biol. Chem.** **107**, p. 449-451, 1934.

WOOLF, I. L. Late onset phenylalanine intoxication. **J. Inher. Metab. Dis. 2**, p. 19-20, 1979.

WYSE, A. T. S.; BOLOGNESI, G.; BRUSQUE, A. M.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C. M. D.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase activity in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats subjected to chemically induced phenylketonuria. **Med. Sci. Res. 23**, p. 261-263, 1995a.

WYSE, A. T. S.; WAJNER, M.; BRUSQUE, A.; WANNMACHER, C. M. D. Alanine reverses the inhibitory effect of phenylalanine and its metabolites on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of rats. **Biochem. Soc. Trans. 23**, p. 2275, 1995b.

WYSE, A. T. S.; SARKIS, J. J. F.; CUNHA-FILHO, J. S.; TEIXEIRA, M. V.; SCHETINGER, M. R.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C. M. D. Effect of phenylalanine and its metabolites on ATP-diphosphohydrolase activity in synaptosomes from rat cerebral cortex. **Neurochem. Res. 19**, p. 1175-1180, 1994.

WYSE, A. T. S.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C. M. D. Kinetics of alanine reversal on the inhibition of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase activity by phenylalanine and phenyllactate in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats. **Med. Sci. Res. 26**, p. 141-143, 1998.

WYSE, A. T. S.; NORILER, M. E.; BORGES, L. F.; FLORIANO, P. J. SILVA, C. G.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C. M. D. Alanine prevents the

decrease of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase activity in experimental phenylketonuria. **Metab. Brain Dis.** **14**, p. 95-101, 1999.