

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

Estudo da inflamação, dano oxidativo e neurodegeneração em pacientes portadores de Fenilcetonúria e em modelo animal de hiperfenilalaninemia: efeito da L-carnitina

JÉSSICA LAMBERTY FAVERZANI

PORTO ALEGRE, 2023



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

Estudo da inflamação, dano oxidativo e neurodegeneração em pacientes portadores de Fenilcetonúria e em modelo animal de hiperfenilalaninemia: efeito da L-carnitina

Tese apresentada por **Jéssica Lamberty Faverzani** para obtenção do  
TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Regla Vargas

Porto Alegre, 2023

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 22 de setembro de 2023, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Alethéa Gatto Barschak  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Dra. Bruna Donida Vancin  
Hospital Ernesto Dornelles

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

#### CIP - Catalogação na Publicação

Faverzani, Jéssica Lamberty  
Estudo da inflamação, dano oxidativo e neurodegeneração em pacientes portadores de Fenilcetonúria e em modelo animal de hiperfenilalaninemia: efeito da L-carnitina / Jéssica Lamberty Faverzani. -- 2023.  
117 f.  
Orientadora: Carmen Regla Vargas.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Fenilcetonúria. 2. Hiperfenilalaninemia. 3. L-carnitina. 4. Estresse Oxidativo. 5. Inflamação. I. Vargas, Carmen Regla, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Metabólitos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (LAM/SGM/HCPA) e na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA/HCPA), os quais disponibilizaram os recursos técnicos e de infraestrutura necessários para a realização do mesmo. Este trabalho foi financiado com auxílio da FAPERGS, CNPq, CAPES e da FIPE/HCPA. Agradecemos aos pacientes e seus familiares, assim como o corpo clínico do SGM/HCPA.



Aos meus pais, Luiz e Nercina.  
Por muitos motivos, mas principalmente pelo amor incondicional.  
Ao Regis. Pelo apoio de sempre. Sempre.



## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre por tornar este trabalho possível.

À professora Carmen Regla Vargas, por me receber em seu laboratório em 2012, e deste então dividir comigo o seu amor pela pesquisa. Obrigada por todos os ensinamentos que vão muito além da bancada do laboratório. Minha admiração, respeito e gratidão por tudo.

Às minhas eternas “chefas”, mas mais que isso, minhas queridas amigas do Laboratório de Análise de Metabólitos do HCPA, Angela e Daniella, pela amizade, apoio e ensinamentos.

Às minhas colegas e amigas do Laboratório de Biomarcadores em Doenças Metabólicas, Bianca, Camila, Desireè, Graziela, Júlia, Marion e Roberta pelo apoio, ajuda e todos os momentos que dividimos. Aos que já passaram pelo grupo de pesquisa, Bruna, Cadu, Cami, Carol e Gi, obrigada por transmitirem seus conhecimentos adiante.

Um agradecimento especial ao Gilian, Fran e Tati, queridos amigos que a pesquisa me trouxe. Obrigada por toda a ajuda, infinitas conversas e troca de conhecimento, e por estarem comigo em todos os momentos.

A família Lamberty por dar sentido à palavra “família”. Principalmente aos meus queridos primos, Bruna, Christopher, Débora, Giséli, Micheli, Paola e William, irmãos que escolhi.

A família Allendorf pela torcida e incentivo.

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

À Katharina e ao Theodoro, sobrinhos/afilhados mais incríveis que alguém poderia ter. A dinda ama muito vocês.

Ao Regis, por caminhar ao meu lado há tantos anos e por me incentivar em todas as decisões que tomei. Te amo muito.

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

A Deus pela proteção e por colocar tantas pessoas incríveis na minha vida.



“Quanto mais as pessoas acreditam em alguma coisa, quanto mais se dedicam a ela, mais podem influenciar o seu acontecimento.”

Bernardino



## RESUMO

A Fenilcetonúria (PKU) é um erro inato do metabolismo dos aminoácidos, causada pela atividade deficiente da enzima fenilalanina hidroxilase, responsável pela hidroxilação da fenilalanina (Phe) em tirosina. Como consequência, ocorre o acúmulo da Phe e seus metabólitos tóxicos no sangue e tecidos dos pacientes. Foi descrito que pacientes com PKU em tratamento hipoproteico apresentam deficiência de L-carnitina (L-car), composto que tem demonstrado um potencial antioxidante e anti-inflamatório em doenças metabólicas. O tratamento dos pacientes consiste em uma dieta restrita em Phe e proteínas, suplementada com uma fórmula dietética, contendo aminoácidos (exceto Phe), vitaminas, minerais e nos últimos anos L-car. O presente trabalho tem por objetivo avaliar o efeito da L-car sobre o dano oxidativo, perfil inflamatório e neurodegeneração em pacientes fenilcetonúricos com diagnóstico precoce e tardio e durante o tratamento, e em modelo animal crônico quimicamente induzido de hiperfenilalaninemia, bem como no estudo comportamental no modelo animal. No primeiro capítulo, avaliamos o efeito causado pelo tempo de exposição a níveis elevados de Phe em pacientes com PKU, diagnosticados precoce e tardiamente, bem como o efeito do L-car em pacientes em tratamento através da dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias e marcadores de estresse oxidativo. Verificamos diminuição nos níveis de Phe e aumento nas concentrações de L-car nos pacientes PKU tratados, indicando a eficácia do tratamento dietético. Correlação inversa entre Phe *versus* L-car e níveis de nitrato mais nitrito *versus* L-car também foi demonstrada. Encontramos níveis aumentados das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IFN-gama, IL-2, TNF-alfa, IL-8 e IL-6 em pacientes com diagnóstico tardio em comparação aos controles, e IL-8 nos pacientes com diagnóstico precoce e tratamento em comparação com indivíduos saudáveis. Foram demonstrados níveis aumentados de IL-2, TNF-alfa e IL-6 nos pacientes com diagnóstico tardio em comparação com o diagnóstico precoce, e níveis reduzidos de IL-6 nos pacientes tratados em comparação com pacientes com diagnóstico tardio. Além disso, verificou-se uma correlação negativa entre IFN-gama e L-car nos pacientes tratados. No entanto, foi observado aumento dos níveis de IL-4 nos pacientes com diagnóstico tardio em comparação com o diagnóstico precoce, e redução nos pacientes tratados em comparação com pacientes com diagnóstico tardio. Na urina, onde não realizados distinção entre os grupos de pacientes com

diagnóstico precoce ou tardio, considerando apenas como grupo diagnóstico, houve um aumento nos níveis de 8-isoprostanos (dano a lipídios) nos pacientes e uma redução nos níveis das espécies de guanina oxidada (dano ao DNA) nos pacientes tratados em comparação com os pacientes no diagnóstico. Assim, a suplementação com L-car induziu efeitos benéficos nesses processos reduzindo ou atenuando os níveis dos biomarcadores aumentados, bem como melhorando a capacidade antioxidante e anti-inflamatória desses pacientes. No segundo capítulo, avaliamos marcadores plasmáticos de neurodegeneração em pacientes com PKU com diagnóstico precoce e tardio e em tratamento. Encontramos redução nos níveis de Phe e aumento das concentrações de L-car em pacientes tratados com L-car. Verificamos aumento de BDNF nos pacientes em tratamento comparado aos pacientes com diagnóstico precoce. Correlação positiva entre BDNF e L-car e correlação negativa entre BDNF e Phe foram observadas. Esses resultados sugerem uma tentativa de ajuste na plasticidade neuronal e recuperação da injúria sofrida, refletindo uma resposta compensatória à lesão cerebral, nos pacientes PKU tratados. No terceiro capítulo, avaliamos os efeitos do tratamento com L-car no córtex cerebral de ratos submetidos a um modelo crônico quimicamente induzido de HPA, avaliando dano oxidativo, neuroinflamação e testes comportamentais. Confirmamos a eficácia do modelo animal, através do aumento de Phe e L-car no sangue e no córtex cerebral. A L-car foi eficaz em diminuir significativamente a geração de espécies reativas (DCF) e atenuar a atividade da superóxido dismutase (SOD). Correlações negativas significativas entre SOD e DCF *versus* L-car foram observadas. Ainda, a L-car atenuou a diminuição dos níveis de IL-4, demonstrando importante efeito anti-inflamatório, além do efeito protetor contra a neuroinflamação, através da diminuição da superexpressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP). No teste de campo aberto, não foi verificada diferença estatística significativa nos parâmetros comportamentais avaliados. Concluímos que o dano oxidativo, a inflamação e neurodegeneração estão envolvidos na fisiopatologia da PKU e que a L-car demonstrou ser um importante adjuvante no tratamento dos pacientes PKU, prevenindo o dano oxidativo e a inflamação tanto a nível periférico em pacientes quanto a nível central em ratos HPA.

**Palavras-chave:** Fenilcetonúria; Hiperfenilalaninemia; Fenilalanina; L-carnitina; Estresse Oxidativo; Inflamação

## ABSTRACT

Study of inflammation, oxidative damage and neurodegeneration in patients with Phenylketonuria and in an animal model of hyperphenylalaninemia: effect of L-carnitine

Phenylketonuria (PKU) is an inborn error of amino acid metabolism, caused by deficient of phenylalanine hydroxylase activity, enzyme responsible for hydroxylation of phenylalanine (Phe) to tyrosine. As consequence, the accumulation of Phe and its toxic metabolites in blood and tissues of phenylketonuric patients occurs. It was described that PKU patients under hypoproteic treatment present L-carnitine (L-car) deficiency, compound that has demonstrated an antioxidant and anti-inflammatory role in metabolic diseases. The treatment for PKU consists in a Phe and protein-restricted diet, supplemented with a dietary formula containing amino acids (except Phe), vitamins, minerals, and in recent years L-car. The present work aims to evaluate the effect of L-car on oxidative damage, inflammatory profile and neurodegeneration in phenylketonuric patients with early and late diagnosis and during treatment, and in a chronic chemically-induced model of hyperphenylalaninemia, as well as in the behavioral study in the animal model. In the first chapter, we evaluated the effect caused by the time of exposure to high levels of Phe in patients with PKU, diagnosed early and late, as well as the effect of L-car in patients in treatment through the measurement of pro and anti-inflammatory cytokines and oxidative stress markers. We verified a decrease in Phe levels and an increase in L-car concentrations in treated PKU patients, indicating the effectiveness of the dietary treatment. Inverse correlation between Phe *versus* L-car and nitrate plus nitrite levels *versus* L-car has also been demonstrated. We found increased pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IFN-gamma, IL-2, TNF-alpha, IL-8 and IL-6 levels in patients at late diagnosis compared to controls, and IL-8 in the patients at early diagnosis and treatment compared to healthy individuals. Increased IL-2, TNF-alpha and IL-6 levels in the patients at late diagnosis compared to early diagnosis were shown, and reduced IL-6 levels in treated patients compared to patients at late diagnosis. Moreover, it verified a negative correlation between IFN-gamma and L-car in treated patients. Otherwise, it was observed that there were increased IL-4 levels in the patients at late diagnosis compared to early diagnosis, and reduction in treated

patients compared to late diagnosed patients. In the urine, where no distinction was made between the groups of patients with early or late diagnosis, considering only as diagnostic group, there was an increase in 8-isoprostanes levels (damage to lipids) in the diagnosed patients and a reduction in the guanine species oxidized levels (DNA damage) in treated patients compared to patients at diagnosis. Thus, L-car supplementation induced beneficial effects in these processes by reducing or attenuating the levels of increased biomarkers, as well as improving the antioxidant and anti-inflammatory capacity of these patients. In the second chapter, we evaluated plasma markers of neurodegeneration in PKU patients with early and late diagnosis and during treatment. We found a reduction in Phe levels and an increase in L-car concentrations in patients treated with L-car. We found an increase in BDNF in treated patients compared to patients at early diagnosis. Positive correlation between BDNF and L-car and negative correlation between BDNF and Phe were observed. These results suggest an attempt to adjust neuronal plasticity and recovery injury suffered, reflecting a compensatory response to brain injury in treated PKU patients. In the third chapter, we evaluated the effects of L-car treatment on cerebral cortex of rats submitted to a chronic chemically-induced model of HPA, evaluating oxidative damage, neuroinflammation and behavioral tests. We confirmed the effectiveness of the animal model, through the increase of Phe and L-car in the blood and in the cerebral cortex. L-car was effective of significantly decreasing the generation of reactive species (DCF) and attenuating the activity of superoxide dismutase (SOD). Significant negative correlations between SOD and DCF *versus* L-car were observed. Thus, L-car attenuated the decrease in IL-4 levels, demonstrating an important anti-inflammatory effect, in addition to the protective effect against neuroinflammation, by decreasing the overexpression of glial fibrillary acidic protein (GFAP). In the open field test, no statistically significant difference was found in the behavioral parameters evaluated. We concluded that oxidative damage, inflammation and neurodegeneration are involved in the pathophysiology of PKU and that L-car proved to be an important adjuvant in the treatment of PKU patients, preventing oxidative damage and inflammation both peripherally in patients and centrally in HPA mice.

**Keywords:** Phenylketonuria; Hyperphenylalaninemia; Phenylalanine; L-carnitine; Oxidative Stress; Inflammation

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 8-OHdG - 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
- BH4 - Tetra-hidrobiopterina
- BHE - Barreira hematoencefálica
- DHPR - Di-hidropteridina redutase
- CAT - Catalase
- EIM – Erros inatos do metabolismo
- EO – Estresse oxidativo
- ER – Espécies reativas
- ERN – Espécies reativas de nitrogênio
- ERO – Espécies reativas de oxigênio
- GFAP – do inglês *glial fibrillary acidic protein* – proteína glial fibrilar ácida
- GPx – Glutaciona peroxidase
- GR – Glutaciona redutase
- GSH – Glutaciona
- GSSG - Glutaciona oxidada
- HPA - Hiperfenilalaninemia
- IL-1 $\beta$  – Interleucina 1beta
- IL-2 – Interleucina 2
- IL-4 – Interleucina 4
- IL-6 – Interleucina 6
- IL-8 – Interleucina 8
- IL-10 – Interleucina 10
- IFN-gama – Interferon gama
- TNF-alfa – Fator de necrose tumoral alfa
- L-car – L-carnitina
- LNAA - aminoácidos neutros de cadeia longa
- MSUD – do inglês *Maple Syrup Urine Disease* - Doença da urina do xarope do bordo
- Phe - do inglês *Phenylalanine* - Fenilalanina
- PAA – do inglês *phenylacetic acid* - Ácido fenilacético
- PAH – do inglês *phenylalanine hydroxylase* - Fenilalanina hidroxilase
- PLA – do inglês *phenyllactic acid* - Ácido fenilático
- PKU - do inglês *Phenylketonuria* - Fenilcetonúria

PPA – do inglês *phenylpyruvic acid* - Ácido fenilpirúvico

CoQ10 – coenzima Q10

SOD – Superóxido dismutase

RL – Radicais livres

TAR – Reatividade antioxidante total

Tyr - do inglês *Tyrosine* – Tirosina

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	21
2. ESTADO DA ARTE .....	23
2.1 Erros Inatos do Metabolismo.....	23
2.1.1 Fenilcetonúria e Hiperfenilalaninemia .....	24
2.1.2 Classificação .....	26
2.1.3 Diagnóstico .....	27
2.1.4 Tratamento.....	28
2.1.5 Manifestações clínicas .....	29
2.1.6 Fisiopatologia .....	30
2.2 Marcadores de Neurodegeneração.....	31
2.3 Radicais Livres e Defesas Antioxidantes.....	32
2.4 L-Carnitina .....	35
2.5 Estresse Oxidativo e Inflamação na Fenilcetonúria.....	36
3. OBJETIVOS .....	39
3.1 OBJETIVO GERAL.....	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
3.2.1 Capítulo I.....	39
3.2.2 Capítulo II.....	39
3.2.3 Capítulo III.....	39
4. RESULTADOS .....	41
4.1 Capítulo I.....	43
4.2 Capítulo II.....	55
4.3 Capítulo III.....	63
5. DISCUSSÃO.....	87
6. CONCLUSÕES .....	101
REFERÊNCIAS.....	103
ANEXOS .....	115
Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética do Hospital em Pesquisa do Clínicas de Porto Alegre.....	115
Anexo 2 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em uso de animais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.....	116
Anexo 3 – Comprovante de submissão do artigo para o periódico Molecular Neurobiology .....	117



# 1. INTRODUÇÃO

---

Fenilcetonúria (“Phenylketonuria” - PKU - OMIM 261600) é um erro inato do metabolismo (EIM) dos aminoácidos caracterizado pela deficiência severa ou ausência na atividade da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH – EC 1.14.16.1), que catalisa a hidroxilação da fenilalanina (“phenylalanine” - Phe) em tirosina (“tyrosine” - Tyr) na presença do cofator tetra-hidrobiopterina (BH<sub>4</sub>). Uma vez que a rota de hidroxilação da Phe esteja bloqueada, a Phe e seus metabólitos tóxicos, fenilacético (PAA), fenil-lático (PLA) e fenilpirúvico (PPA) se acumulam no sangue, fluidos e tecidos corporais e posteriormente são excretados em níveis elevados na urina dos pacientes fenilcetonúricos (SCRIVER e KAUFMAN, 2001; STONE, 2023). Além disso, ocorre a diminuição da concentração do produto Tyr, responsável pela biossíntese de diversos neurotransmissores, como dopamina e norepinefrina (LEHNINGER, 2008; TAM e ROTH, 1997).

A PKU é uma doença de caráter hereditário autossômico recessivo e com uma incidência que varia entre as diferentes nações e os diferentes grupos étnicos do mundo, com prevalência global média estimada de 1:10.000 nascidos vivos (VAN SPRONSEN *et al.*, 2021).

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

O tratamento preconizado para a PKU é baseado numa dieta restrita, com baixo teor de Phe, a fim de reduzir seus níveis, já que o comprometimento neurológico apresentado pelos pacientes está diretamente relacionado com os elevados níveis deste aminoácido (SCRIVER e KAUFMAN, 2001). Essa dieta é geralmente combinada com a administração de uma fórmula especial, livre de Phe, que contém os demais aminoácidos, enriquecida com micronutrientes essenciais

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

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

Estudos já demonstraram o envolvimento dos radicais livres na fisiopatologia de diversas doenças humanas, especialmente em doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, evidenciando o papel do estresse oxidativo - caracterizado pelo desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e substâncias pró-oxidantes no organismo - (HALLIWELL e GUTERRIDGE, 2015) na fisiopatologia de alguns EIM, entre eles as aminoacidopatias, uma vez que o acúmulo de metabólitos tóxicos que acontece nessas doenças pode levar a um aumento excessivo na produção de espécies reativas (BARSCHAK *et al.*, 2006; WAJNER *et al.*, 2004).

Considerando que a fisiopatologia da Fenilcetonúria ainda não é totalmente compreendida, que os pacientes fenilcetonúricos apresentam extensos danos cerebrais com comprometimento neurológico e que o estresse oxidativo já foi descrito estar envolvido nesta doença, torna-se de suma importância melhor compreender estes processos envolvidos nesta doença e os efeitos da L-car, composto antioxidante, na PKU.

## 2. ESTADO DA ARTE

---

### 2.1 Erros Inatos do Metabolismo

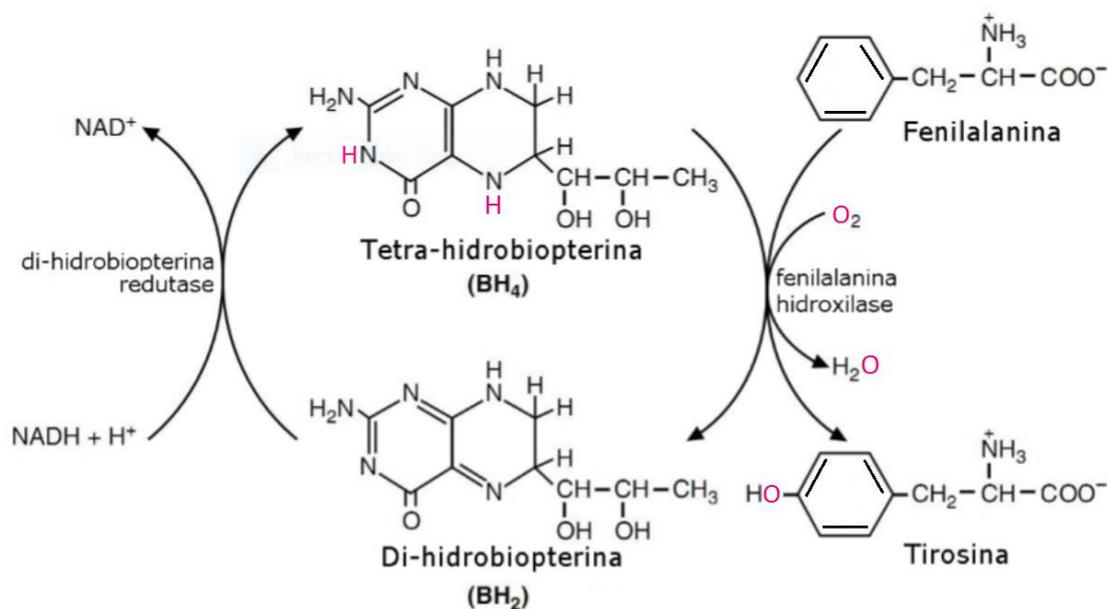
Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são distúrbios genéticos caracterizados pela síntese alterada de uma proteína, geralmente uma enzima, com atividade parcial ou totalmente reduzida, causando interrupção de rotas metabólicas. Esse bloqueio acarreta no acúmulo de substratos e seus derivados, desvio para rotas metabólicas alternativas e diminuição da síntese dos produtos gerados. A repercussão clínica da via afetada é variável, geralmente com sintomatologia grave ou letal (SCRIVER e KAUFMAN, 2001). A primeira menção ao termo EIM foi feita em 1908 por Archibald Garrod ao estudar pacientes com alcaptonúria, doença que causa a excreção de ácido homogentísico na urina. Garrod avaliou que esta era uma condição rara na população em geral e mais frequente em indivíduos de uma mesma família, e que esta condição permanecia por toda a vida (CHILDS, VALLE e JIMENEZ-SANCHEZ, 2001). Apesar de individualmente raros, os EIM em conjunto atingem aproximadamente 1:5.000 nascidos vivos (SOUZA, SCHWARTZ e GIUGLIANI, 2002), correspondendo cerca de 10% de todos os distúrbios genéticos e contabilizando mais de 500 patologias que acometem diversos sistemas e órgãos (CHILDS, VALLE e JIMENEZ-SANCHEZ, 2001), abrangendo uma proporção notável de mortes infantis, reforçando a necessidade de rastreio e diagnóstico (WATERS *et al.* 2018).

De acordo com o fenótipo clínico dos pacientes, Saudubray e Charpentier (2001), classificaram os EIM em três grandes grupos: o primeiro grupo inclui os distúrbios na síntese ou degradação de moléculas complexas, que incluem as doenças lisossômicas de depósito e as doenças peroxissomais. As doenças pertencentes a este grupo apresentam sintomas permanentes, progressivos e não estão relacionadas com a ingestão de alimentos. O segundo grupo consiste nas doenças com deficiência de energia, que incluem as doenças de depósito de glicogênio, defeitos de gliconeogênese, defeitos de oxidação de ácidos graxos, acidemias lácticas congênitas e doenças mitocondriais de cadeia respiratória. Neste grupo de doenças, os sintomas são causados por deficiência na produção ou utilização de energia. Por fim, o terceiro grupo inclui os erros inatos do metabolismo

intermediário, que incluem as aminoacidopatias, as acidúrias orgânicas, os defeitos do ciclo da ureia e as intolerâncias aos açúcares. As doenças deste grupo podem levar à intoxicação aguda ou crônica e possuem relação com a ingestão de alimentos. A intoxicação ocorre pelo acúmulo de componentes tóxicos, provenientes do bloqueio das rotas metabólicas. A Fenilcetonúria, uma aminoacidopatia, faz parte deste grupo.

### 2.1.1 Fenilcetonúria e Hiperfenilalaninemia

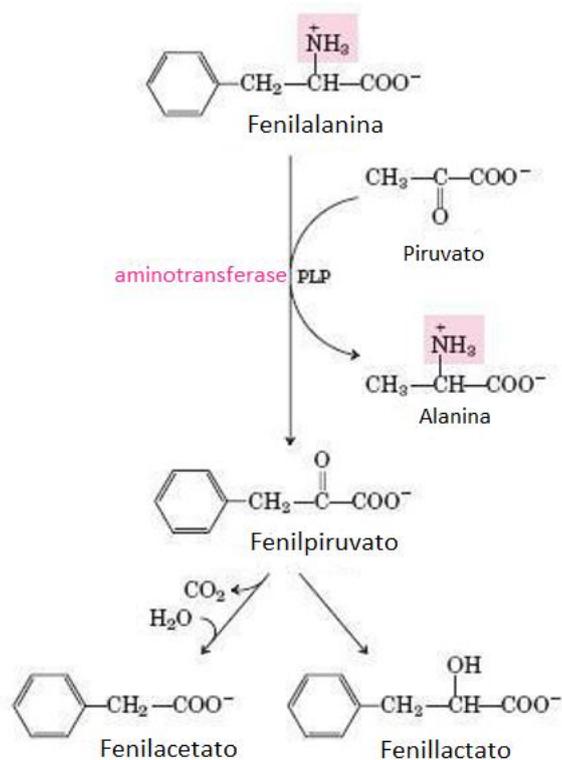
Hiperfenilalaninemia (HPA) é o termo atribuído a elevados níveis de Phe no sangue, causada em sua maioria pela deficiência de sua enzima hepática. A hidroxilação da Phe a Tyr, requer a ação da enzima PAH tendo a BH4 como cofator desta reação. A BH4 sofre redução na reação de hidroxilação e é regenerada pela enzima di-hidropteridina redutase (DHPR – EC 1.6.99.7) dependente de NADH (SCRIVER e KAUFMAN, 2001), conforme ilustrado na figura 1.



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

Com o bloqueio da via de hidroxilação, ocorre a formação de corpos fenilcetônicos que também podem se acumular juntamente com a Phe no sangue, fluidos e tecidos corporais e posteriormente são excretados em níveis elevados na urina dos pacientes fenilcetonúricos (Figura 2) (SCRIVER e KAUFMAN, 2001). Além

disso, ocorre a diminuição da concentração do produto Tyr, precursor de diversos neurotransmissores, como dopamina, adrenalina e norepinefrina (VAN SPRONSEN *et al.*, 2021).



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

Qualquer defeito que interfira na rota da Phe, seja por deficiência na atividade da PAH, da DHPR ou na síntese de BH<sub>4</sub>, causará uma condição de HPA, sendo a deficiência severa na atividade da PAH a principal causa de HPA, conhecida como PKU (SCRIVER e KAUFMAN, 2001).

A PKU é, provavelmente, o EIM dos aminoácidos mais estudado, sendo descoberto em 1934 por Ivar Asbjörn Fölling, ao analisar amostras de urina de dois irmãos com atraso mental e odor corporal semelhante a mofo. Fölling realizou teste na urina e observou a reação ocorrida entre o fenilpiruvato, composto que originou o nome da doença e metabólito da Phe, e o cloreto férrico, que conferia à urina coloração verde (CENTERWALL e CENTERWALL, 2000).

### 2.1.2 Classificação

PKU apresenta diferentes fenótipos, na qual as concentrações de referência de Phe no sangue, entre 35 -120  $\mu\text{mol/L}$ , são excedidas. Historicamente, a classificação da PKU é realizada baseada nos níveis séricos de Phe e no percentual de atividade enzimática apresentada pelos pacientes (VAN SPRONSEN *et al.*, 2021). A PKU clássica, considerada a forma grave da doença, é caracterizada por concentrações plasmáticas de Phe ao diagnóstico superiores a 1200  $\mu\text{mol/L}$  e a tolerância à Phe inferior a 350 mg/dia. Sua atividade residual é praticamente indetectável, podendo ser inferior a 1%. A PKU moderada apresenta concentrações plasmáticas de Phe entre 600 e 1200  $\mu\text{mol/L}$  e uma tolerância à Phe de 350 a 400 mg/dia. A PKU leve caracteriza-se por concentrações de Phe de 360 a 600  $\mu\text{mol/L}$  e uma tolerância de 400 a 600 mg/dia Phe na dieta. A atividade enzimática residual nas duas variantes é inferior a 10% e também requerem tratamento. A HPA leve ou HPA benigna, considerada a forma menos grave da doença, apresenta concentrações plasmáticas de Phe inferiores a 360  $\mu\text{mol/L}$ , tem uma atividade enzimática residual entre 10 e 35%, não causa sintomatologia clínica e não requer tratamento (MARTINS *et al.*, 2009). Dentre os erros congênitos do metabolismo de aminoácidos, a PKU clássica é a doença clinicamente mais encontrada (DE MIRA e MARQUEZ, 2000). No Brasil, 63% dos pacientes apresentam a forma grave da doença (HILLERT *et al.*, 2020).

A PKU apresenta herança autossômica recessiva, com uma incidência que varia substancialmente entre as diferentes etnias e regiões do mundo, com prevalência global média estimada de 1:10.000 nascimentos. A prevalência de PKU é geralmente mais alta em populações brancas ou do leste asiático, sendo 1:10.000 - 15.000 nascidos vivos. A Tailândia possui talvez a menor prevalência da doença, 1:212.535 nascidos vivos. A prevalência na América do Sul varia de 1:25.000 - 50.000 nascidos vivos, com menor prevalência no norte do que no sul do continente (VAN SPRONSEN *et al.*, 2021). No Brasil, a incidência é de aproximadamente 1:25.000 nascidos vivos (HILLERT *et al.*, 2020). Já são mais de 1000 variantes identificadas no gene que codifica a enzima PAH, localizado no cromossomo 12, região 12q23 (BONFIM-FREITAS *et al.*, 2023).

### 2.1.3 Diagnóstico

No Brasil, o "Teste de Guthrie" para detecção da PKU foi introduzido em 1976 pelo médico Benjamin Schmidt em um projeto da Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de São Paulo (APAE-SP), mas foi só em 1992 que o Ministério da Saúde incorporou o Programa Nacional de Triagem Neonatal ao Sistema Único de Saúde (SUS), passando a avaliar a PKU e o Hipotireoidismo Congênito em todos os recém-nascidos vivos (LOPES, 2011).

Atualmente, a realização de Triagem Neonatal para PKU na maioria dos países do mundo resultou em diagnósticos que ocorrem nos primeiros dias de vida, e envolve a coleta de uma gota de sangue do recém-nascido por punção no calcanhar e embora o momento exato da coleta varie entre os países, o momento mais apropriado é entre 24 e 72 horas após o nascimento. O lado externo ou interno do calcanhar do bebê é picado e o sangue pinga em um cartão de papel filtro para que os círculos marcados no cartão fiquem completamente saturados. A fase analítica do processo de triagem consiste na análise bioquímica e encaminhamento do neonato para exames confirmatórios, onde o diagnóstico ocorre pela detecção de níveis elevados de Phe no sangue (VAN SPRONSEN *et al.*, 2021).

Existem diferentes metodologias de triagem laboratorial para a avaliação das concentrações de Phe, e os procedimentos para detecção podem ser feitos através do método de Guthrie, cromatográficos, fluorimétricos, espectrofotométricos (CLAGUE e THOMAS, 2002), detecção da Phe e seus metabólitos na urina ou através de espectrometria de massas em tandem (POLLITT, 2006). Esta última é a metodologia mais utilizada nos países com triagem neonatal. Também é possível realizar o diagnóstico molecular para a identificação da mutação causadora da alteração genética (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

A quantificação dos níveis de Phe no sangue é importante não somente para diagnosticar, mas também para monitorar o tratamento dos pacientes fenilcetonúricos. O diagnóstico precoce a fim de permitir a intervenção dietética, é fundamental para prevenir os principais déficits cognitivos e neurológicos (BLAU *et al.*, 2010; KOHLI *et al.*, 2005; SCRIVER e KAUFMAN, 2001).

### 2.1.4 Tratamento

O tratamento dietético da PKU pode ser bem sucedido principalmente porque a Phe não pode ser sintetizada no corpo e, portanto, é considerada um aminoácido essencial, o que significa que a concentração de Phe no sangue é altamente dependente da sua ingestão dietética (VAN SPRONSEN *et al.*, 2021). O tratamento preconizado para a PKU é baseado numa dieta restrita, com baixo teor de Phe, a fim de reduzir ou normalizar os níveis deste aminoácido, já que o grau de retardo mental está diretamente relacionado com os níveis elevados no plasma e tecidos dos pacientes afetados (SCRIVER e KAUFMAN, 2001). Essa alimentação é geralmente combinada com a administração de uma fórmula sintética, livre de Phe, que contém os demais aminoácidos, enriquecida com micronutrientes essenciais como vitaminas, minerais e elementos traço. Dentre os objetivos do tratamento estão: desenvolvimento e funcionamento neurocognitivo ideal e crescimento normal, estado nutricional, qualidade de vida e bem-estar psicossocial (MACDONALD *et al.*, 2020). Embora a dieta com restrição de Phe tenha se mostrado eficaz, ela não cumpre todos os objetivos do tratamento de maneira ideal.

Para os fenilcetonúricos, alimentos proteicos como carne, ovos, aveia, soja, leite, queijos e pães devem ser evitados (MACDONALD *et al.*, 2020). A dieta deve ser individualizada para cada paciente, pois a tolerância à Phe varia de acordo com a idade, com o peso e também com o grau de deficiência enzimática, geralmente contendo entre 250 mg e 500 mg de Phe/dia, quando o normal de ingestão diária para um indivíduo não fenilcetonúrico é de 2.500 mg de Phe/dia (LEVY, 1999).

Novas estratégias terapêuticas vêm sendo estudadas, como a utilização da Pegvaliase, a enzima fenilalanina amônia-liase injetável, aprovada pelo FDA em 2018, altamente eficaz na redução das concentrações de Phe na maioria dos pacientes, de modo que a maioria deles pode sair do manejo dietético, mas ainda possui seus inconvenientes (BURTON *et al.*, 2020). Outra estratégia estudada é a suplementação com aminoácidos neutros, como a metionina, tirosina e triptofano, que se acredita promover a diminuição dos níveis de Phe no cérebro por competir por um transportador situado na barreira hematoencefálica (BHE) (SARKISSIAN *et al.*, 2009; MATALON *et al.*, 2006). No Brasil, o dicloridrato de sapropterina (nome comercial Kuvan<sup>®</sup>), análogo sintético do cofator BH4, foi proposto para uso de forma complementar à dieta alimentícia por mulheres fenilcetonúricas que estejam

no período pré-concepcional ou em período gestacional, desde que responsivas ao medicamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). O tratamento da PKU perdura por toda a vida, e o prognóstico para aqueles que seguem a dieta é muito melhor.

### **2.1.5 Manifestações clínicas**

Se não tratados, os pacientes fenilcetonúricos podem desenvolver deficiência intelectual grave, epilepsia e problemas comportamentais, psiquiátricos e de movimento, odor de mofo e, em alguns casos, pigmentação mais clara da pele, olhos e cabelos, cegueira cortical e eczema (BLAU *et al.*, 2010). Embora a PAH seja expressa no fígado e nos rins, nenhum dos órgãos sofre qualquer patologia aparente (VAN SPRONSEN *et al.*, 2021).

Se iniciado imediatamente após o nascimento, o tratamento dietético pode prevenir essas sequelas. No entanto, se o tratamento for inadequado por longos períodos de tempo, pacientes adultos podem desenvolver problemas clínicos, incluindo espasticidade dos membros inferiores e ataxia cerebelar, tremor, encefalopatia e anormalidades visuais (JAULENT *et al.*, 2020; RUBIN *et al.*, 2013; THOMPSON *et al.*, 1990). Demência também foi descrita em pacientes com PKU apresentando-se pela primeira vez na idade adulta (ROSINI *et al.*, 2014).

Embora o tratamento dietético da PKU iniciado nos primeiros dias após o nascimento previna os principais déficits cognitivos e neurológicos (AZEN *et al.*, 1991), a incidência de transtorno de déficit de atenção-hiperatividade e dificuldades específicas de aprendizagem, que provavelmente estão relacionadas a déficits nas funções executivas, pode permanecer maior em pacientes fenilcetonúricos bem tratados do que em indivíduos saudáveis (ARNOLD *et al.*, 2004). Concentrações mais altas de Phe devido à dificuldade em aderir ao tratamento dietético rigoroso durante a adolescência e a idade adulta estão associadas ao surgimento de efeitos adversos na atenção, humor, memória e função executiva (BILDER *et al.*, 2016; JAHJA *et al.*, 2017). As avaliações neuropatológicas post-mortem de indivíduos fenilcetonúricos não tratados documentaram tamanho cerebral pequeno e mielinização prejudicada, número de neurônios normal (HUTTENLOCHER, 2000) e complexidade da ramificação dendrítica e número de conexões sinápticas reduzidos (BAUMAN e KEMPER, 1982).

### 2.1.6 Fisiopatologia

Aparentemente, já se conhece todas as manifestações clínicas que acometem os pacientes fenilcetonúricos, mas ainda não entendemos por completo o (s) mecanismo (s) de sua principal manifestação - o retardo mental. Embora muitos estudos venham sendo realizados e hipóteses sugeridas, as causas bioquímicas das complicações neurológicas continuam sendo um campo fértil de investigação (SCRIVER e KAUFMAN, 2001).

Sabe-se que a disfunção cognitiva apresentada pelos pacientes pode estar relacionada à elevada concentração sanguínea de Phe (KAUFMAN, 1989), considerada a principal neurotoxina da doença, embora a HPA não explique completamente toda a cascata da disfunção cerebral (VAN SPRONSEN *et al.*, 2021). Embora as concentrações cerebrais dos fenilcetoácidos acumulados estejam correlacionados positivamente aos níveis plasmáticos de Phe (SARKISSIAN, SCRIVER e MAMER, 2000), os ácidos orgânicos como o fenilpiruvato são rapidamente excretados na urina e suas concentrações nos tecidos são provavelmente muito baixas para terem qualquer consequência clínica, mesmo em pacientes não tratados (VAN SPRONSEN *et al.*, 2021).

Uma das hipóteses de mecanismo está relacionada ao transporte de aminoácidos. Na PKU, o acúmulo de Phe pode dificultar a passagem de outros aminoácidos neutros de cadeia longa ("large neutral amino acid" - LNAA) pela BHE, visto que utilizam o mesmo tipo de transportador, resultando em menor concentração destes outros aminoácidos no cérebro e, conseqüentemente, diminuição de síntese proteica e de neurotransmissores (DE GROOT *et al.*, 2010; HOEKSMAN *et al.*, 2009; SCRIVER e KAUFMAN, 2001). A Tyr acaba se tornando um aminoácido essencial para os pacientes fenilcetonúricos, uma vez que sua rota de síntese está bloqueada na doença. Embora a deficiência de Tyr possa ter um papel no equilíbrio de aminoácidos cerebrais e na deficiência de neurotransmissores, a simples suplementação com Tyr sem qualquer outro tratamento não impede a deficiência intelectual grave nos pacientes fenilcetonúricos (VAN SPRONSEN *et al.*, 2021).

Já foi demonstrado que o metabolismo energético está prejudicado na presença de altas concentrações de Phe em cérebro de ratos, uma vez que a Phe induz a redução na atividade da succinato desidrogenase e dos complexos I-III da

cadeia respiratória em concentrações plasmáticas de Phe semelhantes à encontrada em pacientes (RECH *et al.*, 2002), bem como induz a inibição das enzimas creatina quinase e piruvato quinase em córtex de ratos (COSTABEBER *et al.*, 2003; FEKSA *et al.*, 2002). Outro estudo indicou envolvimento de enzimas que podem estar relacionadas ao dano neurológico encontrado nos pacientes fenilcetonúricos, como a atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase, que está reduzida na membrana sináptica em um modelo animal quimicamente induzido de PKU (WYSE *et al.*, 1995). É provável que múltiplos mecanismos estejam envolvidos, dependendo do estágio de desenvolvimento do cérebro e de quando o tratamento começa (precoce ou tardiamente) (VAN SPRONSEN *et al.*, 2021).

Nos últimos anos tem sido sugerido o envolvimento do estresse oxidativo (EO) na fisiopatologia de vários EIM, entre eles a PKU, devido ao acúmulo de metabólitos tóxicos que podem levar à produção de radicais livres (RL) e/ou à diminuição das defesas antioxidantes (GUERREIRO *et al.*, 2018; DONIDA *et al.*, 2017; MESCKA *et al.*, 2016; MARCHETTI *et al.* 2015; WAJNER *et al.*, 2004). Diversos estudos mostram o aumento dos marcadores de EO tanto em pacientes com PKU (DEON *et al.*, 2015b; VARGAS *et al.*, 2011; RIBAS *et al.*, 2011; SITTA *et al.* 2006, 2009a, b; SIRTORI *et al.*, 2005; SIERRA *et al.*, 1998) como em modelos animais e celular (MORAES *et al.*, 2013; FAVERZANI *et al.*, 2021; FERNANDES *et al.*, 2010; KIENZLE HAGEN *et al.*, 2002). Além disso, a restrição dietética também pode alterar o status antioxidante dos pacientes contribuindo para a indução de EO, que pode ser atenuado pelo uso de antioxidantes (DEON *et al.*, 2015a; RIBAS *et al.*, 2014; SITTA *et al.*, 2009c, 2011).

## **2.2 Marcadores de Neurodegeneração**

A PKU é neuropatologicamente caracterizada por redução da arborização dendrítica, perda de sinapses e neurodegeneração (HÖRSTER *et al.*, 2006). Muitas das doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson (DP) e a doença de Alzheimer (DA), compartilham mecanismos comuns sugerindo que podem ser extrapolados para outras doenças que causam degeneração do tecido cerebral, incluindo os EIM (PETROU e TERZIDAKI 2017; SCAINI *et al.*, 2017).

A literatura mostra que investigações em doenças neurodegenerativas tem relatado a ocorrência de alterações em marcadores envolvidos na plasticidade,

sinaptogênese, neurogênese e mielinização (COVACEUSZACH *et al.*, 2009; KOJIMA e MIZUI, 2017), podendo ser utilizados até mesmo como marcador precoce de doenças como DA, DP e doença de Huntington (BIERER *et al.*, 1995; BRUNO *et al.*, 2009).

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é uma das neurotrofinas mais distribuídas no cérebro, desempenhando um papel importante no crescimento, desenvolvimento e plasticidade cerebral (COLUCCI-D'AMATO *et al.*, 2020), assim como a molécula de adesão neuronal (NCAM) que também desempenha um papel crucial no desenvolvimento neuronal, na plasticidade sináptica e na regeneração (DITLEVSEN *et al.*, 2008).

Outro marcador é o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), uma família de glicoproteínas que possui 2 isoformas homodiméricas A (PDGF-AA), B (PDGF-BB) e 1 heterodimérica (PDGF-AB) tendo como função estimular a proliferação, sobrevivência e migração de células mesenquimais (HELDIN, LENNARTSSON e WESTERMARK, 2018). Catepsina D é a principal protease aspártica lisossomal, e embora sua principal função esteja relacionada ao catabolismo intracelular nos compartimentos lisossômicos, esta protease parece desempenhar um papel importante nos processos que regulam a apoptose (ERDMANN *et al.*, 2008). O inibidor do ativador do plasminogênio-1 total (PAI-1 total) é sintetizado principalmente pelas células endoteliais vasculares, mas também por astrócitos no SNC (GRAMLING e CHURCH, 2010).

Até o momento existem poucos dados na literatura com foco na avaliação de possíveis marcadores neurodegenerativos periféricos na PKU (LI *et al.*, 2010).

### **2.3 Radicais Livres e Defesas Antioxidantes**

Radical livre é um estrutura química com um ou mais elétrons não pareados ocupando um orbital molecular ou atômico sozinho, o que confere uma alta reatividade e instabilidade energética à molécula. Estes radicais podem ser formados endogenamente por diferentes mecanismos, como por fagocitose e pela cadeia de transporte de elétrons, bem como por fatores exógenos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Esses RL cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado no átomo de oxigênio ou nitrogênio são denominados de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), respectivamente.

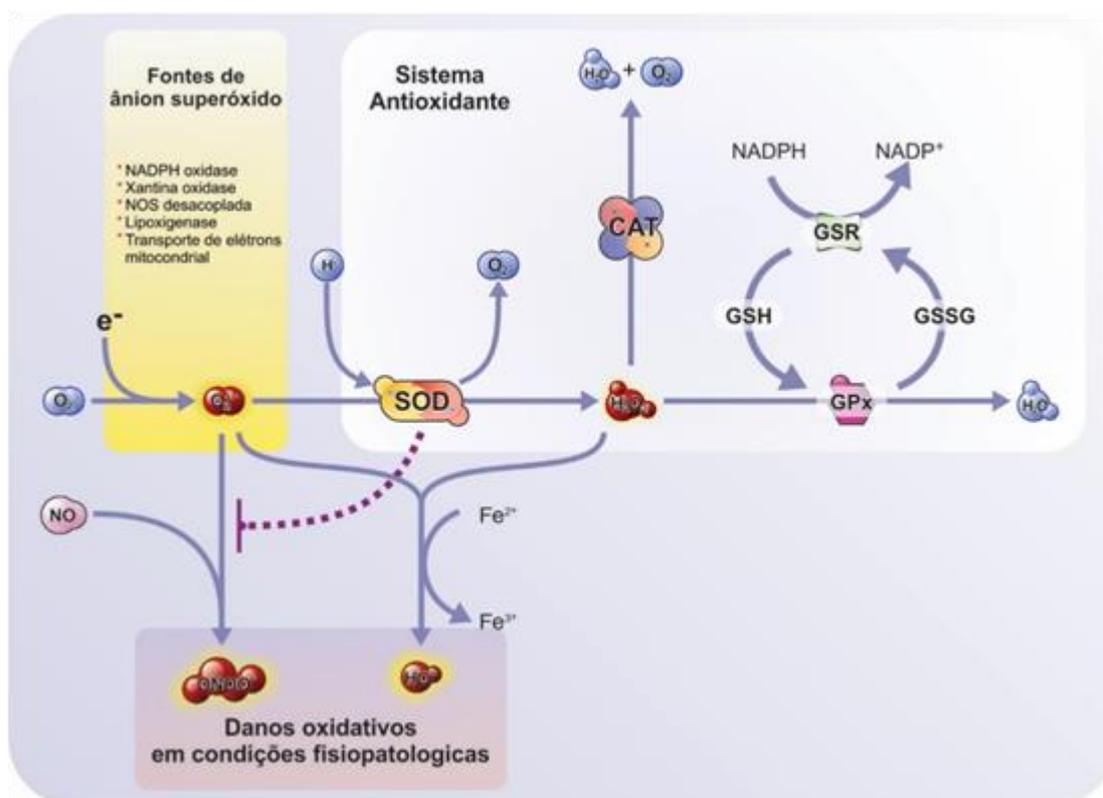
Existem diferentes tipos de RL que são produzidos naturalmente nos sistemas biológicos. No metabolismo celular aeróbio, em condições fisiológicas, em média 95% do oxigênio molecular ( $O_2$ ) sofre redução tetravalente, resultando na formação de água ( $H_2O$ ). Porém, durante esse processo, parte do oxigênio utilizado na respiração mitocondrial não é completamente convertido a  $H_2O$ , podendo formar intermediários reativos, como o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e também a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Assim, o termo ERO incluem não somente os RL, mas também alguns derivados não-radicalares do oxigênio, como o  $H_2O_2$  e o oxigênio *singlet* ( $^1O_2$ ) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

As ERO e ERN ocorrem tanto em condições fisiológicas normais como em processos patológicos do organismo. Caso ocorra um desequilíbrio entre os sistemas de produção e os de remoção dessas espécies reativas (ER), pode resultar em consequências patológicas, como a oxidação de moléculas biológicas, incluindo proteínas, lipídeos e DNA (DEMIRCI-ÇEKIÇ *et al.*, 2022). É importante ressaltar que em processos patológicos a formação dessas ER pode ser exacerbada (ZABLOCKA e JANUSZ, 2008).

De uma forma geral, para se proteger do dano causado pelos RL, os sistemas biológicos desenvolveram mecanismos de defesa antioxidante, bem como sistemas de reparo, capazes de converter estas ER em derivados inativos (HALLIWELL, 1994). A definição clássica para o termo antioxidante é a de qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação a um substrato oxidável, significativamente diminui ou previne a oxidação desse substrato. As defesas antioxidantes que atuam em sistemas biológicos são compostas por antioxidantes enzimáticos e antioxidantes não enzimáticos. Essas defesas agem diminuindo a formação de ER ou removendo-as (ação de sequestro, conhecida como *scavenger*) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

Fazem parte das defesas antioxidantes enzimáticas a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx). A CAT, que está presente principalmente nos peroxissomos, é uma hemoproteína presente em todas as células de mamíferos e catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio, prevenindo a formação de  $OH^{\cdot}$ . A SOD é uma metaloenzima presente em todos os organismos aeróbios, que catalisa a dismutação de  $O_2^{\cdot-}$  reduzindo-o a  $H_2O_2$ , o qual é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a CAT ou GPx. A GPx é uma seleno-enzima encontrada em todos os tecidos animais

e é considerada um dos principais sistemas de defesa antioxidante do organismo, representando a principal defesa mitocondrial contra o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , já que essas organelas, em geral, não possuem CAT. A ação da GPx consiste na oxidação da glutathiona (GSH) a glutathiona oxidada (GSSG), reduzindo o  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). A GSSG consiste de duas GSH ligadas por ponte dissulfeto que pode ser convertida novamente a GSH pela enzima glutathiona redutase (GR) com a utilização de NADPH como coenzima (HALLIWELL, 2006).

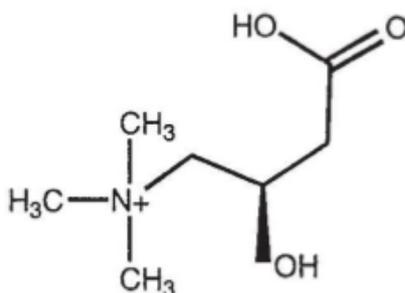


**Figura 3.** Formação do ânion superóxido e sua degradação a outros compostos reativos e inócuos pela ação das enzimas antioxidante. Fonte: Silva e Delgado, 2019.

Os antioxidantes não enzimáticos, que apresentam direta ou indiretamente, capacidade de defesa antioxidante, podem ser representados por moléculas sintetizadas no próprio organismo, como a bilirrubina, ácido úrico, melatonina e glutathiona, ou por compostos obtidos a partir da dieta, como as vitaminas A, C e E, flavonóides, carotenóides, polifenóis, selênio e L-carnitina (L-car) (SALVADOR e HENRIQUES, 2004). O mecanismo de atuação desses antioxidantes é bastante diverso, podendo envolver a remoção do oxigênio presente no meio, o sequestro de ERO ou de seus precursores, inibição da formação de ER, entre outros (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

## 2.4 L-carnitina

A L-car é uma amina quaternária de baixo peso molecular, altamente polar (Figura 3). Em humanos, a L-car pode ser sintetizada no organismo, embora em menor quantidade, a partir dos aminoácidos essenciais lisina e metionina, síntese esta que ocorre no fígado, cérebro e rins (BREMER, 1983). Ela desempenha um importante papel no metabolismo energético, transportando ácidos graxos de cadeia longa presentes no citosol para a matriz mitocondrial para a síntese de ATP através da  $\beta$ -oxidação (FERREIRA e MCKENNA, 2017).



**Figura 4.** Estrutura química da L-carnitina.

Aproximadamente, 75% da L-car presente no nosso organismo é obtida através da dieta, oriunda principalmente de alimentos de origem animal, como carnes, ovos, peixes e leite. Uma vez que a principal fonte dietética de L-car são carne vermelha e laticínios, alimentos esses restritos para pacientes fenilcetonúricos, a deficiência de L-car tem sido descrita nesses pacientes (SITTA *et al.*, 2009a; SCHULPIS *et al.*, 1990).

Nos últimos anos, as fórmulas sintéticas utilizadas no tratamento dos pacientes com PKU possuem em sua composição a L-car. Além disso, trabalhos na literatura têm demonstrado efeitos antioxidantes, antiperoxidativos e anti-inflamatórios para a L-car, incluindo alguns EIM, como acidemias metilmalônica e propiônica (RIBAS *et al.*, 2010a, b), acidemia glutárica tipo I (GUERREIRO *et al.*, 2018), doença da urina do xarope do bordo (MSUD) (MESCKA *et al.*, 2015) e PKU (SITTA *et al.*, 2009c). Diversos mecanismos têm sido propostos, entre eles uma ação sequestradora sobre as ERO, protegendo as células do dano oxidativo (GÜLÇİN, 2006).

Nas últimas décadas, estudos demonstraram que a suplementação com L-car e selênio em pacientes fenilcetonúricos foi capaz de reverter no plasma a peroxidação lipídica e o dano oxidativo protéico, reforçando a importância dos compostos antioxidantes na doença (SITTA *et al.*, 2011). Da mesma forma, Ribas e colaboradores (2010a,b) verificaram efeitos benéficos do tratamento com L-car sobre o dano a lipídeos, proteínas e DNA em pacientes com desordens do metabolismo do propionato. Outros estudos demonstraram que pacientes MSUD possuem deficiência de L-car e que após dois meses de suplementação houve o restabelecimento desses níveis a valores normais, assim como uma diminuição dos valores de lipoperoxidação no plasma dos pacientes suplementados com este composto e um aumento da capacidade antioxidante urinária (MESCKA *et al.*, 2013, 2015).

Além disso, também tem sido atribuído à L-car papel na melhoria das funções imunológicas e ela tem sido sugerida como um agente terapêutico para diversas desordens neurodegenerativas (SOLARSKA *et al.*, 2010). Além disso, foi verificado *in vitro* em leucócitos humanos, através da técnica de ensaio cometa que a L-car em diferentes concentrações foi capaz de diminuir as lesões causadas ao DNA pelo aminoácido leucina e seu  $\alpha$ -cetoácido correspondente, o ácido  $\alpha$ -cetoisocapróico (MESCKA *et al.*, 2014). Pacientes com acidemia glutárica tipo I apresentaram níveis significativamente aumentados de isoprostanos, di-tirosina, espécies de guanina oxidada urinária e ERN, bem como redução da capacidade antioxidante, onde a suplementação com L-car induziu efeitos benéficos reduzindo os níveis destes biomarcadores e aumentando a capacidade antioxidante (GUERREIRO *et al.*, 2018).

## **2.5 Estresse Oxidativo, Inflamação e Fenilcetonúria**

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a capacidade antioxidante e as espécies reativas formadas, em favor destas últimas. Ocorrendo o EO o organismo pode reagir de duas maneiras: adaptando-se ou sofrendo dano celular. Em caso de EO brando, o organismo pode reagir através do aumento da produção de defesas antioxidantes, tentando com isto restabelecer o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante. Mas caso o EO seja severo, pode levar a danos irreversíveis, como a morte celular. Este desequilíbrio pró-oxidante/antioxidante pode causar danos em diversas biomoléculas, podendo resultar na lipoperoxidação das

membranas celulares, oxidação de proteínas e lesão ao DNA/RNA celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

O estresse oxidativo já foi demonstrado em diversas doenças crônico-inflamatórias como diabetes e arterosclerose, doenças vasculares, neoplásicas e neurodegenerativas, como Parkinson, Alzheimer e esclerose múltipla (BEN-MENACHEM, KYLLERMAN e MARKLUND, 2000; LIU *et al.*, 2017; PETROU e TERZIDAKI, 2017; REZNICK *et al.*, 1993). Dessa forma, estudos têm sugerido que o EO também pode contribuir para o dano neurológico observado em algumas aminoacidopatias e outros EIM, uma vez que o acúmulo de metabólitos tóxicos que ocorre nessas desordens pode levar à excessiva produção de espécies reativas que por sua vez podem estar envolvidas no mecanismo de dano cerebral e posterior surgimento de sintomatologia característica desse conjunto de doenças (KOLKER *et al.*, 2004; LATINI *et al.*, 2007). Há anos o EO vem sendo estudado em pacientes e em modelos animais, onde demonstrou sua participação na fisiopatologia da PKU (DEON *et al.*, 2015b; FERNANDES *et al.*, 2010; SITTA *et al.*, 2006; SIRTORI *et al.*, 2005; KIENZLE HAGEN *et al.*, 2002).

A inflamação é caracterizada por ser uma resposta inespecífica a uma agressão, considerada, portanto, uma defesa do organismo contra agentes agressores de origem química, física ou biológica (TILLEY, COFFMAN e KOLLER, 2001), sendo, portanto, a resposta mais precoce quando há uma lesão tecidual ou quadro infeccioso. Os processos inflamatórios são, de certa forma, uma desordem complexa envolvendo diferentes células e componentes moleculares (MURIACH *et al.*, 2014).

A resposta inflamatória encontra-se intimamente relacionada com as defesas antioxidantes e com o EO. Espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio são capazes de alterar diferentes vias de sinalização, estimulando a liberação de citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios. Da mesma maneira, a sustentação de estados inflamatórios pode promover um aumento do EO (OLSEN *et al.*, 2015; MARINHO *et al.*, 2014; HIGDON *et al.*, 2012; OKUN *et al.*, 2011).

Nesse contexto, estudo anterior mostrou aumento de peroxidação lipídica, além de dano oxidativo a proteínas, diminuição da capacidade antioxidante urinária em pacientes fenilcetonúricos tratados com dieta de restrição protéica, além também das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-1 $\beta$  estarem significativamente aumentadas, fornecendo evidências de que ocorre o estado pró-inflamatório nesses pacientes.

Além disso, IL-1 $\beta$  foi correlacionado positivamente com os níveis de isoprostanos, um marcador de dano lipídico. Os resultados deste estudo indicam que ocorrem estados pró-oxidantes e pró-inflamatórios na PKU (DEON *et al.*, 2015b).

Estudos em pacientes fenilcetonúricos demonstram que os mesmos apresentam índices elevados de peroxidação lipídica, dano oxidativo a proteínas e diminuição da reatividade antioxidante total (TAR) (SITTA *et al.*, 2006, 2009a; SIRTORI *et al.*, 2005). Através do ensaio cometa alcalino, foi verificado que a Phe induz dano ao DNA *in vivo* e *in vitro* de maneira dose-dependente em leucócitos de pacientes fenilcetonúricos (SITTA *et al.*, 2009b), e que a co-incubação da Phe com L-car reduziu significativamente o índice de dano ao DNA quando comparada ao grupo controle, indicando que o dano ao DNA na PKU parece estar fortemente correlacionado com as concentrações de Phe no sangue (DEON *et al.*, 2015a). Outro estudo demonstrou que a suplementação com L-car e selênio em pacientes fenilcetonúricos foi capaz de reverter no plasma a peroxidação lipídica e o dano oxidativo protéico, reforçando a importância dos compostos antioxidantes na doença (SITTA *et al.*, 2011). Um aumento nos níveis de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG), um produto do dano oxidativo ao DNA, foi verificado no soro de pacientes PKU com altos níveis de Phe, que foram positivamente correlacionados com os níveis de Phe no plasma (SCHULPIS *et al.*, 2005).

Em modelo animal, demonstrou-se que a Phe *in vitro* diminuiu significativamente as defesas antioxidantes e estimulou a peroxidação lipídica em cérebro de ratos (KIENZLE HAGEN *et al.*, 2002). Ainda, foi verificado *in vitro* que a Phe induziu dano oxidativo a lipídeos e proteínas e diminuiu a concentração de GSH no hipocampo e no córtex cerebral de ratos PKU em desenvolvimento (FERNANDES *et al.*, 2010). Simon e colaboradores (2013) verificaram dano ao DNA no cérebro e no sangue de ratos submetidos à HPA (alta concentração de Phe), sugerindo que o dano ao DNA decorrente das altas concentrações de Phe no cérebro poderia ser, pelo menos em parte, responsável pela disfunção neurológica observada em pacientes PKU.

# 3. OBJETIVOS

---

## 3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da L-carnitina sobre o dano oxidativo, perfil inflamatório e neurodegeneração em pacientes fenilcetonúricos no diagnóstico precoce e tardio e em tratamento e em modelo animal crônico quimicamente induzido de hiperfenilalaninemia, bem como no estudo comportamental no modelo animal.

## 3.2 Objetivos específicos

### 3.2.1. Capítulo I:

Investigar o efeito da L-carnitina contida na fórmula dietética utilizada pelos pacientes fenilcetonúricos no momento do diagnóstico precoce e tardio e durante o tratamento, avaliando perfil inflamatório e dano oxidativo a lipídios, proteínas e DNA, correlacionando os biomarcadores com os níveis séricos de fenilalanina e L-carnitina.

### 3.2.2. Capítulo II:

Avaliar marcadores de neurodegeneração no plasma de pacientes fenilcetonúricos no diagnóstico precoce e tardio e durante o tratamento dietético com fórmula contendo L-carnitina, correlacionando com os níveis de fenilalanina e carnitina livre.

### 3.2.3 Capítulo III:

Avaliar no córtex cerebral de ratos Wistar machos em modelo crônico quimicamente induzido de hiperfenilalaninemia o efeito da L-carnitina sobre parâmetros de comportamento, estresse oxidativo e neuroinflamação, correlacionado esses marcadores com os níveis de carnitina livre.



# 4. RESULTADOS

---

Os resultados desta tese serão apresentados na forma de capítulo/artigo científico.



**4.1 CAPÍTULO I** - Increased cytokine levels induced by high phenylalanine concentrations in late diagnosis PKU patients compared to early diagnosis: Anti-inflammatory effect of L-carnitine

Artigo científico publicado no periódico *Cell Biochemistry & Function* (fator de impacto = 3.963)

*O Capítulo I é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 44 – 54.*

Faverzani JL, Hammerschmidt TG, Mescka CP, Guerreiro G, Lopes FF, Delgado CA, de Moura Coelho D, Sitta A, Deon M, Wajner M, Vargas CR. Increased cytokine levels induced by high phenylalanine concentrations in late diagnosis PKU patients compared to early diagnosis: Anti-inflammatory effect of L-carnitine. *Cell Biochem Funct.* 2023 Jun;41(4):490-500. doi: 10.1002/cbf.3800. Epub 2023 May 12. PMID: 37170672.





















**4.2 CAPÍTULO II** - Increased peripheral of brain-derived neurotrophic factor levels in phenylketonuric patients treated with L-carnitine

Artigo científico publicado no periódico Archives of Biochemistry and Biophysics  
(fator de impacto= 3.9)

*O Capítulo II é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 56 –62.*

Faverzani JL, Guerreiro G, Hammerschmidt TG, Lopes FF, Coelho DM, Sitta A, Mescka CP, Deon M, Wajner M, Vargas CR. Increased peripheral of brain-derived neurotrophic factor levels in phenylketonuric patients treated with l-carnitine. Arch Biochem Biophys. 2023 Nov;749:109792. doi: 10.1016/j.abb.2023.109792. Epub 2023 Oct 18. PMID: 37863349.













**4.3 CAPÍTULO III** - L-carnitine protects oxidative stress and neuroinflammation in cerebral cortex of rats submitted to chronic chemically-induced model of Hyperphenylalaninemia

Artigo científico submetido ao periódico Molecular Neurobiology (fator de impacto = 5.682)

*O texto completo do capítulo III, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 64 – 86, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Este trabalho tem como objetivo avaliar os potenciais efeitos neuroprotetores do tratamento com L-carnitina no córtex cerebral de ratos submetidos a um modelo crônico de hiperfenilalaninemia (HPA) induzido quimicamente, avaliando dano oxidativo cerebral, neuroinflamação e alterações comportamentais. Confirmamos a eficácia do modelo animal, através do aumento de fenilalanina e L-carnitina no sangue e no córtex cerebral. O tratamento com L-carnitina foi eficaz em diminuir significativamente a geração de espécies reativas e atenuar a atividade da superóxido dismutase. Além disso, a L-carnitina atenuou a diminuição dos níveis de IL-4, demonstrando importante efeito antiinflamatório, além do efeito protetor contra a neuroinflamação, através da diminuição da superexpressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) presente no córtex cerebral de ratos HPA. Nossos resultados destacam o papel neuroprotetor do L-carnitina no tratamento da Fenilcetonúria, principalmente contra a neuroinflamação e o processo oxidativo, contribuindo para melhor esclarecer a fisiopatologia da doença.*













































## 5. DISCUSSÃO

---

Clinicamente, os pacientes fenilcetonúricos podem desenvolver deficiência intelectual grave, epilepsia e problemas comportamentais, psiquiátricos e de movimento, eczema, bem como pigmentação leve da pele, olhos e cabelos (VAN SPRONSEN *et al.*, 2021). Se iniciada logo após o nascimento, a restrição da ingestão dietética de Phe previne substancialmente as principais manifestações da PKU, sendo a própria Phe considerada a neurotoxina primária na doença, embora a hiperfenilalaninemia sozinha não consiga explicar toda a cascata de disfunção cerebral que pode acometer o paciente (SCRIVER e KAUFMAN, 2001).

Mesmo após décadas de estudos em pacientes e em modelos animais, os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela neurotoxicidade observada na PKU ainda não estão completamente elucidados (SIERRA *et al.*, 1998; KIENZLE HAGEN *et al.*, 2002; ERCAL *et al.*, 2002; SITTA *et al.*, 2009a; DE GROOT *et al.*, 2010), sendo provável que diferentes mecanismos estejam envolvidos na neurotoxicidade da doença, responsáveis pelas alterações no SNC. Entre os possíveis mecanismos patológicos está a dificuldade de transporte de outros aminoácidos neutros de cadeia longa (LNAA) para dentro do cérebro reduzindo a síntese de neurotransmissores, alterações no metabolismo energético e estresse oxidativo (VAN SPRONSEN *et al.*, 2021).

Muitos são os trabalhos na literatura demonstrando o envolvimento do estresse oxidativo em doenças crônicas, como diabetes e doenças cardiovasculares (PIGNATELLI *et al.*, 2018; WAYHS *et al.*, 2014) e em doenças degenerativas, como nas doenças de Parkinson, Alzheimer e esclerose múltipla (BUTTERFIELD E HALLIWELL, 2019; DIONISIO *et al.*, 2021; TOBORE *et al.*, 2021), corroborando evidências do efeito do desequilíbrio redox em suas fisiopatologias. À essas doenças, incluem-se alguns EIM, como a Fenilcetonúria, onde estudos já descreveram os efeitos do estresse oxidativo e sua relação com os danos neurológicos encontrados nesses pacientes. Essas pesquisas buscam entender os mecanismos envolvidos na doença e possíveis novas abordagens terapêuticas, que colaboram para uma melhora no prognóstico dessas desordens (DEON *et al.*, 2015b; MESCKA *et al.*, 2016; DONIDA *et al.*, 2017; GUERREIRO *et al.*, 2020).

O primeiro capítulo desse trabalho foi elaborado a partir da investigação do efeito da L-carnitina, composto com propriedades antioxidantes contida na fórmula dietética utilizada pelos pacientes, sobre possíveis alterações em biomarcadores de estresse oxidativo e nitrosativo, bem como no perfil inflamatório em pacientes fenilcetonúricos. Essa investigação também avaliou o efeito causado pelo tempo de exposição a elevados níveis de Phe em pacientes diagnosticados precoce e tardiamente e também em pacientes em tratamento, a fim de verificar quais os possíveis benefícios dessa terapia. No segundo capítulo, considerando os extensos e irreversíveis danos neurológicos apresentados pelos pacientes PKU, avaliamos biomarcadores de dano neurogenerativo e investigamos o efeito do tratamento com L-carnitina.

A partir dos resultados encontrados nas primeiras etapas desse trabalho, surgiu a necessidade de melhor entender os efeitos a nível cerebral, uma vez que os principais sintomas da PKU são neurológicos, de maneira a complementar nossos achados e assim, melhorar a compreensão dos efeitos do estresse oxidativo e inflamação, bem como da terapia com carnitina na doença. Em vista desse histórico, no terceiro capítulo desse trabalho nós propusemos uma abordagem em torno da terapia com L-car em um modelo animal de hiperfenilalaninemia conhecido e validado, para que fosse possível conduzir estudos a nível central, mais especificamente, no córtex cerebral. Até a presente data, não existe na literatura artigos científicos avaliando a terapia com L-car à nível central em modelo animal de hiperfenilalaninemia, como o realizado neste estudo.

Mesmo com a PKU sendo uma das doenças pioneiras do Programa Nacional de Triagem Neonatal do Ministério da Saúde/Brasil, nem todos os pacientes brasileiros com PKU são diagnosticados na fase neonatal em nosso país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). Com o atraso no diagnóstico e, conseqüentemente, no início do tratamento, déficits cognitivos e neurológicos podem se desenvolver. Mas se o tratamento for iniciado imediatamente após o nascimento, pode-se evitar essas sequelas (VAN SPRONSEN *et al.*, 2021). Para manter a Phe dentro de níveis considerados adequados, os pacientes são recomendados a seguir uma dieta restrita, com baixa ingestão de proteína, que exclui, completamente, produtos de origem animal e permite o consumo de quantidades controladas de cereais, frutas e vegetais. Consiste em uma dieta hipoprotéica, suplementada com

uma fórmula especial semi-sintética que contém aminoácidos (exceto a Phe), micronutrientes e L-carnitina (SCRIVER e KAUFMAN, 2001; COLOME *et al.*, 2003). A baixa ingestão de proteínas com alto valor biológico diminui, entretanto, a biodisponibilidade de diversos nutrientes, dentre eles, substâncias com ação antioxidante, como o selênio, a L-car e a Coenzima Q10 (SCHULPIS *et al.*, 1990; VAN BAKEL *et al.*, 2000; ARTUCH *et al.*, 2004; SITTA *et al.*, 2011).

Na primeira etapa desse trabalho, foi verificada que os pacientes PKU possuíam níveis elevados de Phe no momento do diagnóstico, tanto realizados precoce como tardiamente, e que esses níveis estavam diminuídos durante o tratamento. Dados da literatura mostram que pacientes fenilcetonúricos com diagnóstico tardio apresentaram indução da lipoperoxidação, bem como uma diminuição da reatividade antioxidante total (TAR) e da atividade da GPx no sangue (SIRTORI *et al.*, 2005), e foi visto que pacientes PKU durante o tratamento dietético (sem uso de L-carnitina), permaneciam com as mesmas alterações na peroxidação lipídica e na redução de antioxidantes (SITTA *et al.*, 2006). Foi demonstrado também que pacientes expostos a altas concentrações de Phe por curto ou longo período de tempo resulta em uma redução das defesas antioxidantes, enquanto o dano oxidativo a proteínas e lipídios ocorre apenas em pacientes expostos por longo período a altas concentrações de Phe (diagnóstico tardio) (SITTA *et al.*, 2009a), reforçando que o processo de estresse oxidativo estava relacionado aos níveis séricos de Phe (SANAYAMA *et al.*, 2011).

Os níveis de Phe também foram avaliados em nosso estudo no modelo animal crônico quimicamente induzido de hiperfenilalaninemia, com aumento significativo nos níveis no plasma (grupo HPA+L-car:  $735 \pm 171$   $\mu\text{mol/L}$ , por exemplo) e no córtex cerebral (grupo HPA+L-car:  $60 \pm 10$   $\mu\text{mol/L}$ , por exemplo), demonstrando que os níveis sanguíneos eram semelhantes às concentrações encontradas em pacientes fenilcetonúricos (MARTINS *et al.*, 2009), confirmando a eficácia do modelo (KIENZLE HAGEN *et al.*, 2002).

A L-carnitina (ácido 4-N-trimetilamônio-3-hidroxibutírico) é uma molécula hidrofílica e altamente polar que desempenha papéis fisiológicos importantes, transportando os ácidos graxos de cadeia longa através da membrana mitocondrial interna para  $\beta$ -oxidação e produção de ATP nos tecidos periféricos e apesar do baixo nível de  $\beta$ -oxidação no cérebro, é ativamente transportada através da BHE e acumula-se nas células neurais. Outra função conhecida é o seu papel na regulação

da função neural através da mediação da transferência de grupos acetil para síntese de acetilcolina (BINIENDA e ALI, 2001). Em pacientes com acidemia glutárica tipo I, a L-car é utilizada para corrigir a deficiência secundária causada pela depleção dos níveis dessa molécula que é utilizada pelo organismo no intuito de promover a remoção do glutaril-CoA e dos outros metabólitos acumulados (GUERREIRO *et al.*, 2019). Além disso, esse composto vem demonstrando possuir um potencial antioxidante devido a sua capacidade de sequestrar radicais livres (função “*scavenger*”) e reduzir a sua formação, entre eles, o radical superóxido, que está envolvido na formação de outras espécies reativas, que por sua vez, são causadores de dano a diferentes biomoléculas (DERIN *et al.*, 2004; GÜLÇİN, 2006). Esse potencial antioxidante também pode estar relacionado pelo aumento da atividade de enzimas envolvidas nas defesas antioxidantes (SOLARSKA *et al.*, 2010). Considerando as diferentes funções já atribuídas a L-car, bem como a deficiência de L-car em pacientes submetidos a restrição proteica, as fórmulas sintéticas utilizadas no tratamento dos pacientes fenilcetonúricos foram adicionadas de L-car em sua composição.

Nós demonstramos que os pacientes PKU em tratamento possuem níveis aumentados de L-car quando comparados aos indivíduos saudáveis e pacientes no momento do diagnóstico precoce e tardio, confirmando que a L-car contida na fórmula dietética utilizada foi capaz de aumentar os níveis desse composto. As doses empregadas no tratamento da PKU podem variar entre a idade e a marca comercial utilizada pelo paciente, sendo de aproximadamente 100-150 mg/kg/dia, dependendo da necessidade e estado clínico do paciente (variando pelo consumo diário total da fórmula dietética). Também encontramos uma correlação inversa significativa entre as concentrações de Phe versus os níveis de L-car em pacientes fenilcetonúricos. Pela primeira vez, foram quantificados, em modelo animal de HPA, níveis de carnitina livre. Esses dados foram mostrados no terceiro capítulo do presente trabalho. De fato, assim como encontrado nos pacientes, os ratos HPA tratados com L-car mostraram aumento dos níveis desse composto comparado aos animais controle e animais com HPA (não tratados com L-car), no sangue e no córtex cerebral. Importante ressaltar que neste modelo, diferente do que encontramos em pacientes PKU sob restrição proteica, os valores de Phe permanecem altos no grupo HPA+L-car (tratados com L-car sem dieta proteica), semelhante aos níveis de Phe encontrado nos animais “doentes” (grupo HPA não

tratado com L-car). Em um aspecto geral, esse perfil semelhante ao encontrado em pacientes nos deu segurança para prosseguir com o estudo no cérebro de animais, uma vez que o modelo se mostrou satisfatório e reproduziu as condições bioquímicas encontradas nos pacientes.

No capítulo I, nós demonstramos que pacientes PKU apresentaram dano a lipídios, o qual foi verificado por meio da dosagem de isoprostanos urinários, um subproduto do metabolismo do ácido araquidônico. Os indivíduos alvo deste estudo apresentaram níveis elevados de isoprostanos comparados ao grupo de indivíduos saudáveis. O tratamento com L-car mostrou uma tendência de normalizar esses níveis indicando uma possível proteção do dano a lipídios. Comparando com outros estudos, muitos deles utilizando modelagem animal, percebe-se que nossos resultados em pacientes estão de acordo com a literatura científica. Ainda, nossos resultados corroboram com dados da literatura em pacientes PKU, onde já foi verificado que a suplementação de L-car e selênio, foi capaz de reduzir as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), outro parâmetro de dano oxidativo lipídico que reflete a quantidade de formação de malondialdeído (MDA), um produto final da peroxidação de ácidos graxos de membrana (SITTA *et al.*, 2011), enfatizando a importância desses compostos antioxidantes nessa doença (SITTA *et al.*, 2009c; SCHULPIS *et al.*, 1990) e reforçando os efeitos antiperoxidativos da L-car (TAN *et al.* 2008; DERIN *et al.* 2004; RANI e PANNEERSELVAM, 2002). Uma vez que o cérebro é particularmente vulnerável aos efeitos deletérios de espécies reativas devido à sua alta demanda metabólica, baixa defesa antioxidante e à densa composição lipídica suscetíveis à oxidação, estudo em modelo animal de HPA demonstrou que filhotes de ratas fenilcetonúricas apresentaram aumento da lipoperoxidação, que foi revertida pelo tratamento com melatonina e vitaminas C e E (MARTINEZ-CRUZ *et al.*, 2002). Também foi demonstrado que a Phe *in vivo* e *in vitro* aumentou a quimioluminescência (outra medida de lipoperoxidação) e reduziu o potencial antioxidante total no tecido cerebral de ratos (KIENZLE HAGEN *et al.*, 2002). Em um modelo de camundongo *Knockout* para PKU (PAH<sup>enu2</sup>), verificou-se aumento de lipoperoxidação (ERCAL *et al.*, 2002) e o dano a lipídios também foi verificado em córtex cerebral de ratos HPA (MORAES *et al.*, 2013), onde foi demonstrado que o tratamento com ácido lipóico *in vivo* e *in vitro* parece ter um papel neuroprotetor ao restaurar a atividade de antioxidantes e prevenir o dano lipídico (MORAES *et al.*, 2010).

No que diz respeito ao dano a proteínas, não encontramos diferença estatística significativa entre pacientes PKU e indivíduos saudáveis nas concentrações urinárias de di-tirosina (Di-tyr), uma molécula formada a partir da oxidação de resíduos de tirosina adjacentes de proteínas, levando à formação de uma ligação inter-fenólica altamente estável (KIRSCHBAUM, 2002). O dano a proteínas já foi relatado em modelo animal (ERCAL *et al.*, 2002; MORAES *et al.*, 2013) e em pacientes fenilcetonúricos pela alteração de diferentes marcadores proteicos (DEON *et al.* 2015a; SITTA *et al.*, 2009a), e foi visto que a suplementação com L-car e o selênio foram capazes de prevenir a oxidação proteica (SITTA *et al.*, 2011). A oxidação de proteínas por espécies reativas pode levar enzimas, receptores e proteínas de transporte ao mau funcionamento e, eventualmente, induzir alterações no metabolismo celular (HALLIWELL e GUTERRIDGE, 2015).

Dentre todos os danos que os radicais livres podem causar às biomoléculas, o dano oxidativo ao DNA é considerado o mais nocivo, podendo causar alterações irreversíveis, levar a mutações genéticas, alterações na expressão gênica, aberrações cromossômicas, neoplasias, perda de função e, por fim, morte celular (JENA, 2012). O dano ao DNA foi verificado no sangue e no cérebro de ratos HPA, sendo sugerido pelos pesquisadores que decorreu das altas concentrações de Phe, podendo ser responsável, pelo menos em parte, pela disfunção neurológica observada nos pacientes PKU (SIMON *et al.*, 2013). Recentemente, foi visto em pacientes PKU tratados que a 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) urinária, estava positivamente correlacionada com os níveis séricos de Phe e negativamente com as concentrações de L-car (DEON *et al.*, 2015b). Outros estudos mostraram que níveis séricos elevados de Phe induziram danos ao DNA em indivíduos saudáveis, avaliado pelo ensaio cometa alcalino (SITTA *et al.*, 2009b), e em células gliais C6 (FAVERZANI *et al.*, 2021), e que o tratamento com L-car reduziu esse dano (FAVERZANI *et al.*, 2021; DEON *et al.*, 2015a), reforçando as propriedades antioxidantes e de eliminação de radicais livres apresentadas pela L-car.

Em nosso estudo, o dano aos ácidos nucleicos foi avaliado por meio da dosagem de espécies urinárias de guaninas oxidadas (8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, 8-hidroxiguanosina e 8-hidroxiguanina, que representam dano ao DNA, RNA e de ambos, respectivamente) em pacientes fenilcetonúricos, nas quais foi observada uma tendência ao aumento deste biomarcador no momento diagnóstico em comparação com controles sadios. Essas espécies são resultantes do ataque de

ERO, em especial o radical hidroxila, aos ácidos nucleicos, ao DNA nuclear e mitocondrial, que são liberadas na urina (COOKE *et al.*, 2003; HALLIWELL e GUTERRIDGE, 2015). A L-car em nosso estudo foi capaz de reduzir esses níveis nos pacientes que estavam em tratamento em comparação aos pacientes no momento do diagnóstico. O aumento nesse biomarcador demonstra que o dano ao DNA encontrado nos pacientes é oriundo de um mecanismo oxidativo (SHI *et al.*, 2012), uma vez que a L-car reduziu este dano.

O aumento do dano as diferentes biomoléculas e a redução das defesas antioxidantes em pacientes PKU podem ser atribuídos ao aumento da geração de espécies reativas nesses pacientes. Além das ERO, ERN também podem ser danosas ao sistema biológico (HALLIWELL, 2001). O óxido nítrico (NO) age como regulador de mecanismos fisiológicos em baixas concentrações e como agente tóxico quando produzido em níveis elevados, e apesar de possuir importantes funções em diferentes sistemas no organismo, quando em contato com  $O_2^-$ , pode gerar  $ONOO^-$  (peroxinitrito), que, por sua vez, é altamente reativo e pode levar a nitrosilação de aminoácidos e perda de função e atividade de proteínas e enzimas (HALLIWELL e GUTERRIDGE, 2015). Ao avaliarmos as ERN, que podem levar ao estresse nitrosativo (EN), medido neste estudo pelo teor de nitrato mais nitrito, não encontramos diferenças estatísticas significativas entre os pacientes avaliados e indivíduos saudáveis, sugerindo que o dano nitrosativo não ocorre em pacientes fenilcetonúricos. Por outro lado, houve uma correlação inversa significativa entre ERN e L-car. Isso, possivelmente, pode ser explicado pelo fato da L-car possuir propriedades antioxidantes contra o dano nitrosativo, evitando a nitração causadas pelo  $ONOO^-$  em resíduos de tirosina de proteínas (NOWAK *et al.*, 2006).

Quando ERO danificam uma biomolécula, a homeostase e suas funções podem ficar comprometidas (HALLIWELL e GUTERRIDGE, 2015). A literatura mostra que os altos níveis de Phe acumulados nos pacientes PKU podem ser capazes de estimular a produção de ERO e reduzir as defesas antioxidantes, como os níveis de glutatona (GSH) (SITTA *et al.*, 2009a). Dessa forma, no terceiro capítulo do nosso trabalho, propusemos avaliar níveis de diclorofluoresceína (DCF), como indicador da formação de espécies reativas e avaliar defesa antioxidante enzimática, através da quantificação de superóxido dismutase (SOD). Nossos resultados corroboraram com aqueles descritos por outros autores. De fato, ratos HPA possuem níveis de SOD aumentados em relação aos animais normais. O mesmo

ocorreu quando foram quantificados os níveis corticais da geração de espécies reativas. Estes resultados indicam um desequilíbrio no estado redox no córtex cerebral dos animais sob hiperfenilalaninemia em favor dos pró-oxidantes, caracterizado pelo aumento de ERO, sendo acompanhado de uma alteração na atividade da enzima antioxidante, como nossos resultados demonstram. Alguns autores verificaram alterações na atividade da SOD em modelo animal de HPA (KIENZLE HAGEN *et al.*, 2002; MAZZOLA *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2013), em cultura de astrócitos de ratos tratados com Phe (PREISSLER *et al.*, 2016) e em eritrócitos de pacientes fenilcetonúricos (GASSIÓ *et al.*, 2008; SANAYAMA *et al.*, 2011). A geração de espécies reativas também foi demonstrada em células gliais C6 (FAVERZANI *et al.*, 2021), cultura de astrócitos (PREISSLER *et al.*, 2016) e ratos HPA (MORAES *et al.*, 2013). Em tempo, uma correlação positiva entre a oxidação de DCF e a atividade da SOD foi observada em nosso estudo, indicando que essa superprodução de espécies reativas pode ter ocorrido por ERO, mais precisamente pela produção do radical superóxido e, conseqüentemente, do peróxido de hidrogênio, uma vez que a enzima SOD metaboliza o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (HALLIWELL e GUTERRIDGE, 2015). Nosso grupo de pesquisa já havia verificado *in vitro* em cultura de células gliais C6 que o pré-tratamento com L-car foi capaz de prevenir a geração de espécies reativas causadas por altas concentrações de Phe (FAVERZANI *et al.*, 2021). Neste estudo demonstramos pela primeira vez na literatura o efeito *scavenger* da L-car sobre a geração de espécies reativas a nível central em córtex cerebral de modelo animal de HPA. Esse resultado da ação sequestradora de radicais livres da L-car é reforçado pela correlação negativa significativa encontrada entre SOD e DCF versus L-car livre.

A inflamação é definida como a resposta de um organismo a uma infecção ou lesão tecidual com o objetivo de eliminar patógenos e lidar com componentes danificados para que o tecido possa ser regenerado. Esse processo é acompanhado pelo aumento de células do sistema imunológico, como leucócitos, macrófagos e linfócitos, bem como expressão aumentada e liberação de componentes, como citocinas e quimiocinas. No entanto, em algumas doenças, este processo pode ser exacerbado com conseqüências graves, levando ao fracasso no processo de resolução e, portanto, a danos graves (WYSE *et al.* 2021). Juntamente com o estresse oxidativo, esses processos são associados com os mecanismos causadores de diversas patologias, como desordens neurodegenerativas e doenças

neurometabólicas (HALLIWELL e GUTERRIDGE, 2015). Uma vez que a carnitina possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, e considerando também o fato da suplementação com L-car contribuir para prevenir ou atenuar o estresse oxidativo em pacientes afetados por diferentes EIM (MESCKA *et al.*, 2015; RIBAS *et al.*, 2014), e sabendo da associação existente entre estresse oxidativo e inflamação, avaliamos no nosso estudo marcadores inflamatórios e o efeito da L-car sobre esse processo.

Dando seguimento ao nosso estudo, avaliamos o perfil inflamatório nos pacientes fenilcetonúricos por meio da dosagem das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IFN-gama e TNF-alfa e das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10. Nós observamos que os pacientes PKU que tiveram seu diagnóstico tardio, apresentaram aumento nos níveis de todas as citocinas pró-inflamatórias dosadas comparado a indivíduos saudáveis. Esse resultado indica um estado pró-inflamatório nesses pacientes. Nesse contexto, destaca-se que o aumento de citocinas pró-inflamatórias pode estar relacionado a uma produção excessiva de espécies reativas, contribuindo para a inflamação (LUGRIN *et al.*, 2014).

Também encontramos níveis aumentados das citocinas IL-2, IL-6 e TNF-alfa nos pacientes com diagnóstico tardio comparado a pacientes no diagnóstico precoce. Esse resultado sugere que o estado pró-inflamatório apresentado pelos pacientes é devido ao maior tempo de exposição a níveis elevados de Phe. Reforçando nossos achados, um estudo anterior demonstrou correlação positiva entre IL-1 $\beta$  e níveis de isoprostano, um marcador de dano lipídico, em pacientes PKU tratados, sugerindo que estados pró-oxidantes e pró-inflamatórios ocorrem na PKU (DEON *et al.*, 2015b).

Verificamos também que os níveis da citocina IL-8 estavam aumentados nos pacientes tratados em comparação com os controles, resultado semelhante ao encontrado por Deon e colaboradores (2015b), com aumento de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-1 $\beta$ . A expressão de IL-8 é estimulada por diferentes fatores, incluindo a produção de espécies reativas e fatores pró-inflamatórios TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e anti-inflamatória IL-4 (GALIC, RIAZI e PITTMAN, 2012; ZEINALI, ABDOLRAHIM e HOSSEINZADEH, 2017). Pacientes com doenças inflamatórias geralmente apresentam níveis reduzidos de compostos antioxidantes, o que pode ser devido a sua ingestão insuficiente ou a alta demanda de consumo, podendo ser devido aos

altos níveis de ERO ativadas por células imunocompetentes (MESCKA *et al.*, 2015; MANGGE *et al.*, 2014; MUÑOZ e COSTA, 2013).

A diminuição significativa dos níveis da IL-6 nos pacientes tratados de nosso estudo, foi observada. Esse resultado demonstra que o tratamento dietético com L-car foi capaz de reduzir os níveis dessa citocina pró-inflamatória, demonstrando o efeito anti-inflamatório da L-carnitina. Estudos anteriores em outros EIM reforçam o papel benéfico do L-car contra o processo pró-inflamatório, como o estudo de Mescka e colaboradores (2015) em que foi administrada L-car por 2 meses para pacientes com MSUD e o estudo de Guerreiro e colegas (2021) que administrou L-car em modelo animal nocaute de acidemia glutárica tipo 1. Nesse contexto, também observamos uma correlação inversa significativa entre a citocina pró-inflamatória IFN-gama e L-car, reforçando o efeito anti-inflamatório desse composto, uma vez que a suplementação com L-car diminuiu significativamente ou mostrou tendência a diminuir os marcadores pró-inflamatórios testados.

Ao avaliarmos citocinas anti-inflamatórias, verificamos que os níveis da IL-4 estavam aumentados nos pacientes com diagnóstico tardio comparado aos diagnosticados precocemente, e diminuídos nos pacientes tratados comparados aos pacientes diagnosticados tardiamente. Esta alteração encontrada pode representar uma tentativa de reparar a resposta à inflamação, uma vez que a mesma atua nos macrófagos ativados, modulando os efeitos de outras citocinas, como a IL-1, TNF-alfa, IL-6 e IL-8, e inibindo a produção de radicais livres de oxigênio (SOMMER *et al.*, 2010). As respostas inflamatórias não são simples reações sequenciais, mas de natureza caótica. Células e mediadores inflamatórios podem ter propriedades múltiplas e diferentes em determinadas condições (LEE *et al.*, 2002). Não encontramos diferença nas concentrações de IL-10 entre os pacientes PKU e os indivíduos saudáveis estudados.

A partir dos resultados encontrados a nível periférico nos pacientes PKU, seguimos com a avaliação a nível cerebral em modelo animal da doença. Avaliamos em córtex cerebral os níveis da citocina IL-4, onde verificamos uma diminuição da capacidade anti-inflamatória nos ratos hiperfenilalaninêmicos (“fenilcetonúricos”). Os resultados discordantes encontramos neste estudo entre pacientes PKU e animais HPA pode ter ocorrido pelo fato dos pacientes possuírem idade média de 14 anos e, portanto, um maior tempo de exposição a cronicidade da doença, diferente dos ratos HPA que foram tratados por 8 dias, sendo portanto, um menor tempo de exposição,

o que justificaria um papel regulatório da IL-4 nos pacientes e não nos ratos HPA. O tratamento com L-car demonstrou ser benéfico contra a inflamação, apresentando um importante efeito anti-inflamatório a nível central, uma vez que os animais HPA tratados com L-car apresentaram concentrações de IL-4 no córtex cerebral equivalentes aos ratos controle.

Avaliamos no córtex de animais submetidos à HPA a proteína glial fibrilar ácida (“glial fibrillary acidic protein” - GFAP), que é considerada um marcador de astrócitos, localizada principalmente em compartimentos do citoesqueleto. Os astrócitos respondem às alterações no SNC através de alterações morfológicas e funcionais que influenciam a atividade neuronal. Quando o SNC é submetido a situações de agressão, os astrócitos podem tornar-se hipertróficos ou assumir um fenótipo reativo. Assim, a alta expressão de GFAP é uma das principais características associadas aos astrócitos reativos no contexto de lesão e inflamação (MESCKA *et al.*, 2021). A GFAP está envolvida na regulação do volume dos astrócitos, na formação de cicatrizes gliais e na ancoragem dos transportadores de glutamato na membrana plasmática para facilitar a reciclagem de neurotransmissores. Além disso, um papel crítico na interação neurônio-glia e na morfogênese do SNC é desempenhado por esta proteína. Descobertas recentes sugerem o envolvimento da GFAP na manutenção a longo prazo da arquitetura cerebral, na função adequada da BHE e na modulação de algumas funções neuronais (SHAN *et al.*, 2018).

No nosso estudo, uma superexpressão da GFAP foi observada no córtex de ratos HPA comparado aos animais controle, indicando um processo neuroinflamatório cortical significativo nestes animais. Esse resultado corrobora com dados da literatura, onde um aumento da expressão de GFAP foi observada em cerebelo de ratos HPA (USHAKOVA *et al.*, 1997) e em córtex de ratos MSUD (MESCKA *et al.*, 2021). A coloração de GFAP também foi observada em pacientes com doença de Alzheimer (HOL *et al.*, 2003) o que reforça que a expressão desta proteína pode estar relacionada a danos neuronais ou neurodegeneração. Verificamos, pela primeira vez na literatura, o efeito protetor da L-car sobre a neuroinflamação em modelo crônico de ratos HPA, uma vez que os animais HPA submetidos à administração de L-car demonstram níveis diminuídos de GFAP comparado aos ratos não tratados com L-car.

Buscamos também neste estudo, avaliar marcadores de neurodegeneração na PKU. Recentemente diversas pesquisas envolvendo doenças neurodegenerativas

tem focado em encontrar marcadores plasmáticos de neurodegeneração, com o intuito de desvendar como a deterioração neuronal ocorre, bem como descobrir novos biomarcadores nessas desordens (GUERREIRO *et al.*, 2019; SCAINI *et al.*, 2017). Nesse sentido, algumas moléculas têm se mostrado úteis, como BDNF, Catepsina D, NCAM, PDGF e PAI-1, as quais foram analisadas no plasma dos pacientes PKU neste estudo. Neste estudo os resultados mostraram um aumento significativo nas concentrações de BDNF nos pacientes em tratamento com L-car. Além disso, pode-se observar uma tendência a diminuição do BDNF nos pacientes PKU com diagnóstico tardio. O BDNF desempenha um papel fundamental na proliferação e manutenção de neurônios sensoriais e colinérgicos, neurônios motores espinhais e alguns neurônios dopaminérgicos, sendo fundamental na plasticidade sináptica, aprendizagem e memória (PRADHAN *et al.*, 2019). Alterações nas concentrações de BDNF já foram encontradas em doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, em distúrbios psiquiátricos e em processos de envelhecimento associadas ao seu mecanismo fisiopatológico, no entanto, foi observada uma diminuição nas concentrações circulantes desta proteína (COVACEUSZACH *et al.*, 2009; MIRANDA *et al.*, 2019). O aumento dos níveis de BDNF já foi relatado em algumas patologias cerebrais, mas pouco se sabe sobre o seu papel na fisiopatologia de doenças neurometabólicas hereditárias. Guerreiro e colaboradores quantificaram os níveis de BDNF em pacientes com acidemia glutárica tipo I também tratados com L-car, e observaram resultado semelhante ao encontrado no nosso estudo (GUERREIRO *et al.*, 2020). A literatura demonstrou que o BDNF desempenhou um importante papel na proteção dos neurônios da apoptose induzida pela Phe (ZHANG *et al.*, 2010), estudo que pode nos ajudar a compreender a sinalização celular responsável pelo BDNF, sendo uma proteína promissora, possivelmente capaz de atenuar a lesão cerebral da PKU, o que corrobora nossos resultados. Outro estudo demonstrou aumento nos níveis de BDNF no córtex de pacientes com epilepsia do lobo temporal, removidos após cirurgia de ressecção cerebral. Esse aumento encontrado estava relacionado à grande demanda por ajustes de plasticidade, necessários para tentar recuperar o tecido cerebral dos danos causados pelas convulsões (MARTÍNEZ-LEVY *et al.*, 2017).

Além disso, verificamos uma correlação negativa entre os níveis de BDNF e Phe e positiva entre as concentrações de BDNF e L-car nos pacientes estudados, sugerindo que a diminuição dos níveis de Phe, aminoácido acumulado na doença e

envolvido no mecanismo de dano cerebral, possa estar associada aos efeitos benéficos da L-car, que parece melhorar os níveis de BDNF. Assim, pode-se presumir que os elevados níveis plasmáticos de BDNF encontrados em pacientes fenilcetonúricos tratados podem refletir uma resposta compensatória à lesão cerebral, estando aumentado devido à grande demanda por ajuste na plasticidade.

Em relação aos demais marcadores de neurodegeneração avaliados (catepsina D, NCAM, PDGF-AB/BB e PAI-1 total), não encontramos diferença significativa entre os grupos estudados. Indo de encontro a este resultado, avaliamos a nível central no córtex cerebral dos ratos HPA outros marcadores de neurodegeneração, catepsina B e catepsina total e também, não encontramos diferença significativa entre os animais testados.

No intuito de entender o efeito da L-car sobre o comportamento no modelo animal dos ratos HPA utilizamos o teste de campo aberto. Este ensaio tem como objetivo avaliar a atividade exploratória dos animais e é utilizado em estudos da base neurobiológica da ansiedade e na triagem de novos alvos de drogas e compostos ansiolíticos (KRAEUTER *et al.*, 2019). Latência para início da locomoção, número de crossings, número de rearings e bolos fecais foram avaliados. Em relação a latência para iniciar o movimento, número de crossings e número de rearings, não encontramos diferença significativa entre os grupos avaliados. Em relação ao número de bolos fecais, nenhum dos animais apresentou esse parâmetro de ansiedade (dados não apresentados).

Assim, neste trabalho, nós fornecemos resultados sólidos e inovadores, demonstrando que um estado pró-oxidante e pró-inflamatório está envolvido na fisiopatologia da Fenilcetonúria e que a L-carnitina tem um papel protetor a nível central e periférico muito eficaz no tratamento desse distúrbio. Portanto, nossos dados sustentam a visão de que a suplementação com L-car é útil não apenas por restaurar as concentrações desse composto no organismo, mas também pelos benefícios antioxidantes, anti-inflamatórios e neuroprotetores a ela atribuídos.



## 6. CONCLUSÕES

---

Os resultados obtidos nesta tese permitem concluir que os pacientes fenilcetonúricos apresentam um estado pró-oxidante e pró-inflamatório, principalmente em pacientes com diagnóstico tardio. A ação antioxidante sobre a resposta inflamatória da L-carnitina também foi descrita. Nossos dados mostram a importância do diagnóstico neonatal e início imediato do tratamento dietético contendo L-carnitina.

Existe uma tentativa de ajuste na plasticidade neuronal na busca de recuperar o dano cerebral sofrido, que pode refletir em uma resposta compensatória à lesão cerebral nos pacientes PKU tratados com fórmula dietética contendo L-carnitina.

No modelo animal crônico quimicamente induzido de hiperfenilalaninemia, avaliando o córtex cerebral, destacamos o papel protetor da L-carnitina contra a neuroinflamação e processo oxidativo.

Assim, considerando que os mesmos achados verificados perifericamente em pacientes fenilcetonúricos, foram encontrados no tecido cerebral de modelo animal de hiperfenilalaninemia, podemos presumir que o estresse oxidativo e o processo inflamatório, decorrentes dos altos níveis de fenilalanina, participam do dano cerebral encontrado nos pacientes PKU, contribuindo para a fisiopatologia da doença.

Desta forma, reforçamos a importância da terapia com L-carnitina, sendo um importante adjuvante no tratamento dos pacientes fenilcetonúricos, devendo ser mantida juntamente à terapia preconizada.



# REFERÊNCIAS

---

- AGARWAL, A.; SAID, T.M. Carnitines and male infertility. **Reprod Biomed Online**. 8(4):376-384. 2004.
- ARNOLD, G.L.; VLADUTIU, C.J.; ORLOWSKI, C.C.; BLAKELY, E.M.; DELUCA, J. Prevalence of stimulant use for attentional dysfunction in children with phenylketonuria. **J Inherit Metab Dis**. 27(2):137-43. 2004.
- ARTUCH, R.; et al. A longitudinal study of antioxidant status in phenylketonuric patients. **Clin Biochem**. 37:198-203. 2004.
- AZEN, C.G.; et al. Intellectual development in 12-yearold children treated for phenylketonuria. **Am. J. Dis. Child**. 145, 35–39.1991.
- BARSCHAK, A.G.; et al. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. **Metab Brain Dis**. 21(4):279-86. 2006.
- BAUMAN, M.L.; KEMPER, T.L. Morphologic and histoanatomic observations of the brain in untreated human phenylketonuria. **Acta Neuropathol**. 58:55–63. 1982.
- BEN-MENACHEM, E.; KYLLERMAN, M.; MARKLUND, S. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase function in progressive myoclonus epilepsies. **Epilepsy Res**. 40(1):33-9. 2000.
- BIERER, L.M.; HOF, P.R.; PUROHIT, D.P.; CARLIN, L.; SCHMEIDLER, J.; DAVIS, K.L.; PERL, D.P. Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. **Arch Neurol**. 52(1):81-8. 1995.
- BILDER, D.A.; et al. Systematic review and meta- analysis of neuropsychiatric symptoms and executive functioning in adults with phenylketonuria. **Dev. Neuropsychol**. 41:245–260. 2016.
- BINIENDA, Z.K.; ALI, S.F. Neuroprotective role of L-carnitine in the 3-nitropropionic acid induced neurotoxicity. **Toxicol Lett**. 15;125(1-3):67-73. 2001.
- BLAU, N.; VAN SPRONSEN, F.J.; LEVY, H.L. Phenylketonuria. **Lancet**. 376(9750):1417-1427. 2010.
- BONFIM-FREITAS, P.E.; ANDRADE, R.S.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â.K.; SILVA, L.C.S. Molecular characterization of phenylketonuria patients from the North Region of Brazil: State of Pará. **Mol Genet Genomic Med**. 8:e2224. 2023.
- BREMER, J. Carnitine metabolism and functions. *Physiol Rev*. 63:1420-1480. 1983.
- BRUNO, M.A.; LEON, W.C.; FRAGOSO, G.; MUSHYNSKI, W.E.; ALMAZAN, G.; CUELLO, A.C. Amyloid beta-induced nerve growth factor dysmetabolism in Alzheimer disease. **J Neuropathol Exp Neurol**. 68(8):857-69. 2009.

BURTON, B.K.; LONGO, N.; VOCKLEY, J.; GRANGE, D.K.; HARDING, C.O.; DECKER, C.; LI, M.; LAU, K.; ROSEN, O.; LARIMORE, K.; THOMAS, J.; PAL-002 AND PAL-004 INVESTIGATORS. Pegvaliase for the treatment of phenylketonuria: Results of the phase 2 dose-finding studies with long-term follow-up. **Mol Genet Metab.** 130(4):239-246. 2020.

BUTTERFIELD, D.A.; HALLIWELL, B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. **Nat Rev Neurosci.** 20(3):148-160. 2019.

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

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

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

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

COLUCCI-D'AMATO, L.; SPERANZA, L.; VOLPICELLI, F. Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. **Int J Mol Sci.** 21(20):7777. 2020.

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

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

COVACEUSZACH, S.; CAPSONI, S.; UGOLINI, G.; SPIRITO, F.; VIGNONE, D.; CATTANEO, A. Development of a non invasive NGF-based therapy for Alzheimer's disease. **Curr Alzheimer Res.** 6(2):158-70. 2009.

DA SILVA, F.B.; DELGADO, N.T.B. Aterosclerose e atividade do sistema antioxidante enzimático. **Rev. Espaço Acadêmico.** 9(2) 2178-3829. 2019.

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

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

DEMIRCI-ÇEKIÇ, S.; ÖZKAN, G.; AVAN, A.N.; UZUNBOY, S.; ÇAPANOĞLU, E.; APAK, R. Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **J Pharm Biomed Anal.** 5:209:114477. 2022.

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

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

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

DIONÍSIO, P.A.; AMARAL, J.D.; RODRIGUES, C.M.P. Oxidative stress and regulated cell death in Parkinson's disease. **Ageing Res Rev.** 67:101263. 2021.

DITLEVSEN, D.K.; POVlsen, G.K.; BEREZIN, V.; BOCK, E. NCAM-induced intracellular signaling revisited. **J Neurosci Res.** 86(4):727-43. 2008.

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

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

ERDMANN S, et al. Inflammatory cytokines increase extracellular procathepsin D in permanent and primary endothelial cell cultures. **Eur J Cell Biol.** 87(5):311-23. 2008.

FAVERZANI J.L.; et al. L-carnitine protects DNA oxidative damage induced by phenylalanine and its keto acid derivatives in neural cells: a possible pathomechanism and adjuvant therapy for brain injury in phenylketonuria. **Metab Brain Dis.** 7:1957-1968. 2021.

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

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

FERREIRA, G.C.; MCKENNA, M.C. L-Carnitine and Acetyl-L-carnitine Roles and Neuroprotection in Developing Brain. **Neurochem Res.** 42(6):1661-1675. 2017.

GALIC, M.A.; RIAZI, K.; PITTMAN, Q.J. Cytokines and brain excitability. **Front Neuroendocrinol.** 33(1):116-25. 2012.

GASSIÓ, R.; et al. Cognitive functions and the antioxidant system in phenylketonuric patients. **Neuropsychology.** 22(4):426-31. 2008.

GRAMLING, M.W.; CHURCH, F.C. Plasminogen activator inhibitor-1 is an aggregate response factor with pleiotropic effects on cell signaling in vascular disease and the tumor microenvironment. **Thromb Res.** 125(5):377-81. 2010.

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

GUERREIRO, G.; et al. L-carnitine prevents oxidative stress in striatum of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice submitted to lysine overload. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.** 1865(9):2420-2427. 2019.

GUERREIRO, G.; DIAZ JAQUES, C.E.; WAJNER, M.; VARGAS, C.R. Elevated levels of BDNF and cathepsin-d as possible peripheral markers of neurodegeneration in plasma of patients with glutaric acidemia type I. **Int J Dev Neurosci.** 80(1):42-49. 2020.

GUERREIRO, G.; et al. Protective effects of L-carnitine on behavioral alterations and neuroinflammation in striatum of glutaryl-COA dehydrogenase deficient mice. **Arch Biochem Biophys.** 709:108970. 2021.

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

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

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging.** 18(9):685-716. 2001.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol.** 141(2):312-22. 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxidative stress and redox regulation: adaptation, damage, repair, senescence and death. In: Halliwell B, Gutteridge JMC 5ª edição (eds) **Free radicals in biology and medicine.** Oxford University Press, Oxford, pp 199-283. 2015.

HELDIN, C.H.; LENNARTSSON, J.; WESTERMARK, B. Involvement of platelet-derived growth factor ligands and receptors in tumorigenesis. **J Intern Med.** 283(1):16-44. 2018.

HIGDON, A.; DIERS, A.R.; OH, J.Y.; LANDAR, A.; DARLEY-USMAR, V.M. Cell signalling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanisms. **Biochem J.** 442: 453–464. 2012.

HILLERT, A; et al. The Genetic Landscape and Epidemiology of Phenylketonuria. **Am J Hum Genet.** 107(2):234-250. 2020.

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

HOL, E.M.; et al. Neuronal expression of GFAP in patients with Alzheimer pathology and identification of novel GFAP splice forms. **Mol Psychiatry.** 8(9):786-96. 2003.

HUTTENLOCHER, P.R. The neuropathology of phenylketonuria: human and animal studies. **Eur. J. Pediatr** 159 (Suppl 2), 102–106. 2000.

JAHJA, R.; et al. Long- term follow- up of cognition and mental health in adult phenylketonuria: a PKU- COBESO study. **Behav. Genet.** 47:486–497. 2017.

JAULENT, P.; et al. Neurological manifestations in adults with phenylketonuria: new cases and review of the literature. **J. Neurol.** 267:531–542. 2020.

JENA, N.R. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. **J Biosci.** 37(3):503-17. 2012.

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

KIENZLE HAGEN, M.E.; et al. Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1586, 344–352. 2002.

KIRSCHBAUM, B. Correlative studies of urine fluorescence and free radical indicators. **Clin Nephrol.** 58(5):344-9. 2002.

KOHLI, S.; et al. Prenatal diagnosis of phenylketonuria. **Indian. J Med Res.** 122:400-403. 2005.

KOJIMA, M.; MIZUI, T. BDNF Propeptide: A Novel Modulator of Synaptic Plasticity. **Vitam Horm.** 104:19-28. 2017.

KÖLKER, S.; KOELLER, D.M.; OKUN, J.G.; HOFFMANN, G.F. Pathomechanisms of neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Ann Neurol.** 55(1):7-12. 2004.

KRAEUTER, A.K.; GUEST, P.C.; SARNYAI, Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. **Methods Mol Biol.** 1916:99-103. 2019.

LATINI, A.; et al. Induction of Oxidative Stress by Chronic and Acute Glutaric Acid Administration to Rats. **Cell Mol Neurobiol.** 27(4):423–438; 2007.

LEE, S.W.; et al. Anti-inflammatory effects of IL-4 and IL-10 on human polymorphonuclear leukocytes. **J Korean Med Sci.** 17(1):7-14. 2002.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M. M. Principles of Biochemistry. New York, Freeman and Company, 5<sup>a</sup> edição. 2008.

LEVY, H.L. Phenylketonuria: old disease, new approach to treatment. **Proc Natl Acad Sci USA,** 96(5):1811-3. 1999.

LI, D.; GU, X.; LU, L.; LIANG, L. Effects of phenylalanine on the survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in primary cultures: possible involvement of brain-derived neurotrophic factor. **Mol Cell Biochem.** 339(1-2):1-7. 2010.

LIU, Z.; ZHOU, T.; ZIEGLER, A.C.; DIMITRION, P.; ZUO, L. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. **Oxid Med Cell Longev.**2017:2525967. 2017.

LOPES, M. E. M. O exitoso" teste do pezinho" faz dez anos no Brasil!. **Ciência & Saúde Coletiva**, v16(1)716-717, 2011.

LUGRIN, J.; ROSENBLATT-VELIN, N.; PARAPANOV, R.; LIAUDET, L. The role of oxidative stress during inflammatory processes. **Biol Chem.** 395(2):203-30. 2014.

MACDONALD A.; et al. PKU dietary handbook to accompany PKU guidelines. **Orphanet J Rare Dis.** 30;15(1):171. 2020. Erratum in: **Orphanet J Rare Dis.** 1;15(1):230. 2020.

MANGGE, H.; BECKER, K.; FUCHS, D.; GOSTNER, J.M. Antioxidants: inflammation and cardiovascular disease. **World J Cardiol.** 6:462–477. 2014.

MARCHETTI, D.P.; et al. Protective effect of antioxidants on DNA damage in leukocytes from X-linked adrenoleukodystrophy patients. **Int J Dev Neurosci.** 43:8-15. 2015.

MARINHO, H.S.; REAL, C.; CYRNE, L.; SOARES, H.; ANTUNES, F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. **Redox Biol.** 2: 535–562. 2014.

MARTINEZ-CRUZ, F.; POZO, D.; OSUNA, C.; ESPINAR, A.; MARCHANTE, C.; GUERRERO, J.M. Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: Prevention by melatonin, vitamin E, and vitamin C. **J Neurosci Res.** 15;69(4):550-8. 2002.

MARTÍNEZ-LEVY, G.A.; et al. Increased Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor Transcripts I and VI, cAMP Response Element Binding, and Glucocorticoid Receptor in the Cortex of Patients with Temporal Lobe Epilepsy. **Mol Neurobiol.** 55(5):3698-3708. 2018.

MARTINS, F.F.; et al. Metabolismo do cálcio na Fenilcetonúria. **Rev Nutr.** 22(3):419-428. 2009.

MATALON, R.; et al. Large neutral amino acids in the treatment of phenylketonuria (PKU). **J. Inherit. Metab. Dis.** 29(6):732-738. 2006.

MAZZOLA, P.N.; et al. Regular exercise prevents oxidative stress in the brain of hyperphenylalaninemic rats. **Metab Brain Dis.** 26(4):291-7. 2011.

MESCKA, C.; et al. Protein and lipid damage in maple syrup urine disease patients: L-carnitine effect. **Int J Dev Neurosci.** 31:21-24. 2013.

MESCKA, C.P.; et al. Investigation of inflammatory profile in MSUD patients: benefit of L-carnitine supplementation. **Metab Brain Disease.** 30:1167-1174. 2015.

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

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

MESCKA, C.P.; et al. Preliminary results of PBA-loaded nanoparticles development and the effect on oxidative stress and neuroinflammation in rats submitted to a chemically induced chronic model of MSUD. **Metab Brain Dis**. 36(5):1015-1027. 2021.

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

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

MIRANDA, M.; MORICI, J.F.; ZANONI, M.B.; BEKINSCHTEIN, P. Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain. **Front Cell Neurosci**. 13:363. 2019.

MORAES, T.B.; et al. Lipoic acid prevents oxidative stress in vitro and in vivo by an acute hyperphenylalaninemia chemically-induced in rat brain. **J Neurol Sci**. 15;292(1-2):89-95. 2010.

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

MUÑOZ, A.; COSTA, M. Nutritionally mediated oxidative stress and inflammation. **Oxidative Med Cell Longev**. 2013:610950. 2013.

MURIACH, M.; FLORES-BELLVER, M.; ROMERO, F.J.; BARCIA, J.M. Diabetes and the brain: oxidative stress, inflammation, and autophagy. **Oxid Med Cell Longev**. 2014:102158. 2014.

NOWAK, P.; SALUK-JUSZCZAK, J.; OLAS, B.; KOŁODZIEJCZYK, J.; WACHOWICZ, B. The protective effects of selenoorganic compounds against peroxynitrite-induced changes in plasma proteins and lipids. **Cell Mol Biol Lett**. 11:1–11. 2006.

OKUN, E.; GRIFFIOEN, K.J.; MATTSON, M.P. Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. **Trends Neurosci**. 34: 269–281. 2011.

OLSEN, R.K.J.; CORNELIUS, N.; GREGERSEN, N. Redox signalling and mitochondrial stress responses; lessons from inborn errors of metabolism. **J Inherit Metab Dis**. 38: 703–719. 2015.

PETROU, A.L.; TERZIDAKI, A. A meta-analysis and review examining a possible role for oxidative stress and singlet oxygen in diverse diseases. **Biochem J**. 474(16):2713-2731. 2017.

PIGNATELLI, P.; MENICHELLI, D.; PASTORI, D.; VIOLI, F. Oxidative stress and cardiovascular disease: new insights. **Kardiol Pol.** 76(4):713-722. 2018.

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

PREISLER, T.; et al. Phenylalanine induces oxidative stress and decreases the viability of rat astrocytes: possible relevance for the pathophysiology of neurodegeneration in phenylketonuria. **Metab Brain Dis.** 31(3):529-37. 2016.

PRADHAN, J.; NOAKES, P.G.; BELLINGHAM, M.C. The Role of Altered BDNF/TrkB Signaling in Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Front Cell Neurosci.** 13;13:368. 2019.

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

RANI, P.J.; PANNEERSELVAM, C. Effect of L-carnitine on brain lipid peroxidation and antioxidant enzymes in old rats. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.** 57(4):B134-7. 2002.

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

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

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

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

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

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

ROSINI, F.; RUFA, A.; MONTI, L.; TIRELLI, L.; FEDERICO, A. Adult-onset phenylketonuria revealed by acute reversible dementia, prosopagnosia and parkinsonism. **J. Neurol.** 261:2446-2448. 2014.

RUBIN, S.; et al. Sight-threatening phenylketonuric encephalopathy in a young adult, reversed by diet. **JIMD Rep.** 10:83-85. 2013.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J.A.P. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. Canoas. **Ed ULBRA.** 204p. 2004.

SANAYAMA, Y.; et al. Experimental evidence that phenylalanine is strongly associated to oxidative stress in adolescents and adults with phenylketonuria. **Mol Genet Metab.** 103(3):220-225. 2011.

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

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

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

SCAINI, G.; et al. Serum Markers of Neurodegeneration in Maple Syrup Urine Disease. **Mol Neurobiol.** (7):5709-5719. 2017.

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

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

SHAN, F.; LONG, Y.; QIU, W. Autoimmune Glial Fibrillary Acidic Protein Astrocytopathy: A Review of the Literature. **Front Immunol.** 5(9):2802. 2018.

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

SHI, F.; et al. Oxidative damage of DNA, RNA and their metabolites in leukocytes, plasma and urine of *Macaca mulatta*: 8-oxoguanosine in urine is a useful marker for aging. **Free Radical Research**, 46(9):1093-1098. 2012.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SOMMER, C.; WHITE, F. Cytokines, Chemokines, and Pain, in: BEAULIEU, P.; et al. Pharmacology of Pain. 1st Ed, Seattle, IASP Press. 279-302. 2010.

SOUZA, C.F.M.; SCHWARTZ, I.V.D.; GIUGLIANI, R. Triagem neonatal e distúrbios metabólicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 129–137, 2002.

STONE, W.L.; BASIT, H, LOS E. Phenylketonuria. In: StatPearls [Internet]. **StatPearls Publishing.** Treasure Island. 2023.

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

TAN, X.; HU, S.H.; WANG, X.L. The effect of dietary l-carnitine supplementation on pulmonary hypertension syndrome mortality in broilers exposed to low temperatures. **J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).** 92(2):203-10. 2008.

THOMPSON, A.J.; et al. Neurological deterioration in young adults with phenylketonuria. **Lancet.** 336:602–605.1990.

TILLEY, S.L.; COFFMAN, T.M.; KOLLER, B.H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. **J Clin Invest.** 108(1):15-23. 2001.

TOBORE, T.O. Oxidative/Nitroxidative Stress and Multiple Sclerosis. **J Mol Neurosci.** 71(3):506-514. 2021.

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(1):29-36. 1997.

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

VAN SPRONSEN, F.J.; BLAU, N.; HARDING, C.; BURLINA, A; LONGO, N; BOSCH A.M. Phenylketonuria. **Nat Rev Dis Primers.** 7(1):36. 2021.

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

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

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

WATERS, D.; ADELOYE, D.; WOOLHAM, D.; WASTNEDGE, E.; PATEL, S.; RUDAN, I. Global birth prevalence and mortality from inborn errors of metabolism: a systematic analysis of the evidence. **J Glob Health.** 8(2):021102. 2018.

WAYHS, C.A; et al. Diabetic encephalopathy-related depression: experimental evidence that insulin and clonazepam restore antioxidant status in rat brain. **Cell Biochem Funct.** 32(8):711-9. 2014.

WYSE, A.T.S.; DOS SANTOS, T.M.; SEMINOTTI, B.; LEIPNITZ, G. Insights from Animal Models on the Pathophysiology of Hyperphenylalaninemia: Role of Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress and Inflammation. **Mol Neurobiol.** 58(6):2897-2909. 2021.

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

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

ZEINALI, M.; REZAEI, S.A.; HOSSEINZADEH, H. An overview on immunoregulatory and anti-inflammatory properties of chrysin and flavonoids substances. **Biomed Pharmacother.** 92:998-1009. 2017.

ZHANG, Y.; ZHAO, J.; WANG, J.; JIAO, X. Brain-derived neurotrophic factor inhibits phenylalanine-induced neuronal apoptosis by preventing RhoA pathway activation. **Neurochem Res.** 35(3):480-6. 2010.



# ANEXOS

---

## ANEXO 1: CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

Carta de Aprovação

**Projeto**

2021/0618

**Pesquisadores:**

CARMEN REGLA VARGAS

FRANCIELE FÁTIMA LOPES

VITORIA VOLFART DA ROCHA

ANGELA SITTA

JESSICA LAMBERTY FAVERZANI

**Número de Participantes:** 20

**Título:** Estudo dos mecanismos inflamatórios, de dano oxidativo e neurodegeneração em pacientes portadores de fenilcetonúria: efeito da L-carnitina

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

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

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

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

## ANEXO 2 - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

Carta de Aprovação

Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

**Projeto:** 2019/0584

**Título:** Estudo dos mecanismos inflamatórios, de dano oxidativo e neurodegeneração em modelo animal de hiperfenilalaninemia: efeito da L-carnitina e coenzima Q10

**Pesquisador Responsável:** CARMEN REGLA VARGAS

**Equipe de Pesquisa:**

CARLOS EDUARDO DIAZ

GILIAN BATISTA BALBUENO  
GUERREIRO

ALANA PIMENTEL MOURA

JESSICA LAMBERTY FAVERZANI

**Data de Aprovação:** 13/01/2020

**Data de Término:** 31/03/2023

Espécie/Linhagem	Sexo/Idade	Quantidade	Data Reunião	Documento
RATO HETEROGÊNICO	M/6 Dia(s)	288		
RATO HETEROGÊNICO	F/3 Mês(es)	36		

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

## ANEXO 3 – COMPROVANTE SUBMISSÃO DE ARTIGO NO PERIÓDICO MOLECULAR NEUROBIOLOGY

18/11/2023, 12:24

Email – Jéssica Lamberty Faverzani – Outlook

### MOLN-D-23-01513 -Acknowledgement of Receipt

Molecular Neurobiology <em@editorialmanager.com>

Qua, 08/11/2023 18:50

Para: Jéssica Lamberty Faverzani <jelamberty@hotmail.com>

08 Nov 2023

Dear Mrs Faverzani:

This is to acknowledge receipt of your manuscript titled "L-Carnitine protects oxidative stress and neuroinflammation in cerebral cortex of rats submitted to chronic chemically-induced model of Hyperphenylalaninemia." Your manuscript number will be sent to you in a second email.

The submission id is: MOLN-D-23-01513

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

Your username is: Jessica Lamberty

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <https://www.editorialmanager.com/moln/>.

Thank you very much for your contribution.

Sincerely,

Benedict C. Albenesi, PhD, BCMAS, CRQM

Editor in Chief

P.S.: If your manuscript is accepted for publication in Molecular Neurobiology, you may wish to have it published with open access in our Open Choice program. For information about the Open Choice program, please access the following URL: <http://www.springer.com/openchoice>

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on [www.springer.com/openchoice](http://www.springer.com/openchoice)). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to [www.springer.com/oafunding](http://www.springer.com/oafunding). Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

This letter contains confidential information, is for your own use, and should not be forwarded to third parties.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/moln/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.