

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica

***Efeito da silibinina sobre parâmetros de estresse oxidativo
contra a neurotoxicidade da fenilalanina***

MELAINE TERRA

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, 2014.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica

***Efeito da silibinina sobre parâmetros de estresse oxidativo
contra a neurotoxicidade da fenilalanina***

MELAINE TERRA

Orientador: Dr. Carlos Severo Dutra-Filho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2014.

Aos meus pais!

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço pelo apoio constante dos meus pais. Obrigada por acreditarem em mim e por fazerem todo o possível para que eu seja uma pessoa realizada em todos os sentidos.

Agradeço ao meu namorado, Lucas, por me amar, por me dar forças, e por sempre estar disposto a ajudar e a me fazer feliz.

Aos meus irmãos, Bibiana e Manoel, por serem pessoas tão especiais.

A todos os meus familiares, pela alegria.

Ao meu orientador, Dutra, por me proporcionar essa grande oportunidade de aprendizado, tanto acadêmica quanto pessoal.

Às minhas queridas amigas e irmãs de coração: Fernanda, Gabriella, Sabrina, Mariana e Danielle. Agradeço por serem grandes exemplos pra mim, por trazerem muitos momentos de alegria, pelos conselhos sempre sábios e pelo fato de que sempre posso contar com vocês.

A todos os amigos do Lab 34D, meu muitíssimo obrigada. Giovana, Carlos, Juliana, Raylane, Priscila, Tarsila: a ajuda de vocês foi fundamental para realização desse trabalho, e a amizade também. Caroline, Andrea, Julia, Laila, Fernanda e Gabriel, obrigada por tudo.

A todos os professores e a todos os funcionários do Departamento de Bioquímica, obrigada pela gentileza e apoio para a execução deste trabalho.

Por último, e mais importante, agradeço a Deus por iluminar meus caminhos, me dar força, saúde, alegria e por encher minha vida de pessoas maravilhosas que tanto contribuem para o meu crescimento.

Índice

Parte I

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
INTRODUÇÃO	11
1. Erros Inatos do Metabolismo	11
1.1. Fenilcetonúria	12
2. Radicais Livres	16
3. Sistema de Defesa Antioxidante	17
4. Estresse Oxidativo	18
4.1. Estresse Oxidativo e Fenilcetonúria	19
5. Silibinina	21
OBJETIVOS	23
Objetivo Geral	23
Objetivos Específicos	23

Parte II

Artigo submetido – Silibinin prevents oxidative stress in the cerebral cortex of hyperphenylalaninemic rats	26
--	----

Parte III

DISCUSSÃO	55
CONCLUSÃO	61
Conclusão Geral	61
Conclusões Específicas	61
PERSPECTIVAS	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

Parte I

RESUMO

A fenilcetonúria (PKU) é uma doença metabólica causada pela deficiência da enzima fenilalanina hidroxilase, levando ao acúmulo de fenilalanina. As principais características clínicas dos pacientes com PKU não tratados são o comprometimento neuropsicológico e o retardo no desenvolvimento. O estresse oxidativo tem sido detectado em muitos erros inatos do metabolismo, incluindo PKU. A silibinina é um flavonoide proveniente da planta cardo de leite (*Silybum marianum*) que apresenta propriedades antioxidantes e que, após administração, é amplamente distribuída pelos tecidos. Neste trabalho, nós investigamos os efeitos da silibinina *in vivo* e *in vitro* contra o estresse oxidativo causado por elevados níveis de fenilalanina. Ratos machos e fêmeas, com 12 dias de vida no início dos experimentos, receberam injeções subcutâneas de α -metilfenilalanina e fenilalanina para realizar o modelo agudo de hiperfenilalaninemia, e o tratamento com silibinina consistiu em injeções intraperitoniais da substância na dose de 20 mg/kg. Os animais foram mortos no 14º dia de vida. Para realizar os experimentos *in vitro*, homogeneizados de córtex cerebral de ratos de 14 dias de vida foram incubados com fenilalanina e silibinina. *In vitro* e *in vivo*, a silibinina foi capaz de prevenir a inibição provocada pela fenilalanina nas atividades das enzimas catalase, glutathione peroxidase e glicose-6-fosfato desidrogenase. Não foram verificadas diferenças entre os grupos nas atividades da superóxido dismutase e da glutathione redutase. Além disso, a silibinina preveniu as alterações provocadas pela fenilalanina no conteúdo de carbonilas proteicas, nas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e na produção de espécies reativas. A silibinina preveniu o dano oxidativo induzido pela fenilalanina e pode ser uma potencial terapia complementar para o tratamento da PKU.

Palavras-chave: fenilcetonúria, hiperfenilalaninemia, estresse oxidativo, antioxidante, silibinina

ABSTRACT

Phenylketonuria (PKU) is a metabolic disorder caused by a deficiency of phenylalanine hydroxylase, leading to accumulation of phenylalanine. The main clinical features of non-treated PKU patients are neuropsychological impairment and developmental retardation. Oxidative stress has been related to many inborn errors of metabolism including PKU. Silibinin is a flavonoid derived from the herb milk thistle (*Silybum marianum*) which presents antioxidant properties and is widely distributed into tissues after administration. In this study, we investigated the *in vivo* and *in vitro* effects of silibinin against oxidative stress caused by high levels of phenylalanine. Male and female rats, 12 days old at the beginning of experiments, received subcutaneous injections of α -methylphenylalanine and phenylalanine to produce hyperphenylalaninemia, and intraperitoneal injections of 20 mg/kg silibinin. The animals were killed on the 14th day of life. To perform *in vitro* experiments, cerebral cortex homogenates of 14 days old rats were incubated with phenylalanine and silibinin. *In vivo* and *in vitro*, silibinin was able to prevent the inhibition provoked by phenylalanine on the activities of catalase, glutathione peroxidase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. No differences were found among the groups in the activities of superoxide dismutase and glutathione reductase. Moreover, silibinin prevented the alterations provoked by phenylalanine on protein carbonyl content, thiobarbituric acid-reactive substances and production of reactive species. Silibinin prevented oxidative damage induced by phenylalanine and may be a potential adjunctive therapy to PKU treatment.

Keywords: phenylketonuria, hyperphenylalaninemia, oxidative stress, antioxidant, silibinin.

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT – Catalase

DCF – 2',7' diclorofluoresceína

ERO – Espécies reativas de oxigênio

GPx – Glutathiona peroxidase

GR – Glutathiona redutase

HPA – Hiperfenilalaninemia

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

PKU – Fenilcetonúria

Sil – Silibinina

SOD – Superóxido dismutase

INTRODUÇÃO

1. Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo são doenças genéticas hereditárias caracterizadas por alterações na síntese, degradação, transporte ou armazenamento de biomoléculas. Como consequência dessas alterações, pode ocorrer o acúmulo – muitas vezes em níveis tóxicos - de metabólitos nas células e fluidos corporais ou a deficiência de produtos intermediários ou finais de rotas metabólicas específicas (Martins, 1999).

Uma possível classificação para os erros inatos do metabolismo divide-os em três grupos. No primeiro, estão incluídas doenças que afetam a síntese ou o catabolismo de macromoléculas. No segundo grupo, incluem-se doenças que afetam o metabolismo intermediário, dentre as quais a fenilcetonúria. No terceiro grupo, estão os defeitos na produção energética ou na sua utilização (Saudubray e Charpentier, 2001).

Atualmente, são conhecidos mais de 500 erros inatos do metabolismo (Alfadhel et al., 2013). Apesar de serem doenças raras, em sua totalidade têm grande representatividade ao sistema de saúde devido à gravidade dos sintomas associado ao grande número de doenças (Dickson et al., 2011).

1.1. Fenilcetonúria

A fenilcetonúria (PKU) é um erro inato do metabolismo de caráter autossômico recessivo. A doença é caracterizada pela deficiência da enzima fenilalanina hidroxilase, a qual é responsável pela hidroxilação do aminoácido essencial fenilalanina, formando tirosina como produto. Nessa reação, o cofator tetraidrobiopterina é utilizado. Os valores plasmáticos normais de fenilalanina encontram-se por volta de 60 μM ; quando se verifica níveis de fenilalanina plasmática superiores a 120 μM , o quadro é definido como hiperfenilalaninemia (HPA); valores superiores a 1000 μM podem ser encontrados em pacientes PKU não tratados (Scriver e Kaufman, 2001).

Em 1934, o médico norueguês Asbjörn Fölling descreveu pela primeira vez a doença PKU. Após realizar uma série de testes com amostras de urina de dois irmãos que apresentavam retardo mental, Fölling identificou a presença de ácido fenilpirúvico, cuja reação com cloreto férrico forma um composto de cor verde. A partir da descoberta da doença, testes de triagem neonatal foram sendo aperfeiçoados e difundidos em vários países, e fórmulas dietéticas com restrição de fenilalanina foram desenvolvidas para o tratamento de PKU. (Centerwall e Centerwall, 2000).

A frequência de PKU é de 1:14000 nascidos vivos (Wilcken e Wiley, 2008). Todavia, a taxa pode variar em diferentes regiões do mundo. Na Turquia, onde se verifica elevado número de casamentos consanguíneos na população, a incidência da doença é de 1:4000 nascimentos (Ozalp et al., 2001). No Brasil, a incidência é estimada em 1:12000 a 1:15000, porém os

números podem estar subestimados devido à incompleta cobertura no país dos programas de triagem neonatal (Monteiro e Cândido, 2006).

Localiza-se no cromossomo 12, apresentando 13 éxons, o gene humano que codifica a enzima fenilalanina hidroxilase (Lidsky et al., 1985). Tanto mutações neste gene, quanto nos genes que codificam proteínas envolvidas na síntese e regeneração de tetraidrobiopterina, podem causar HPA; no segundo caso, a mutação pode levar à HPA não-PKU (Michals-Matalon et al., 2007). Dependendo do efeito que exercerem sobre a estrutura e a atividade da enzima, algumas mutações no gene da fenilalanina hidroxilase podem ser mais graves do que outras, resultando em diferentes graus de HPA (Williams et al., 2008).

O bloqueio metabólico que impede a conversão do aminoácido essencial fenilalanina em tirosina gera o acúmulo de fenilalanina no plasma e nos tecidos dos pacientes. Acumulam-se também os metabólitos fenilpiruvato, fenilacetato e fenilactato, formados por transaminação e descarboxilação nas vias alternativas do catabolismo da fenilalanina (Nyhan, 1984) (Figura 1). Quando em excesso, tanto a fenilalanina quanto os metabólitos são tóxicos ao sistema nervoso central (Scriver e Kaufman, 2001). Em pacientes PKU não tratados, ocorrem manifestações clínicas como atraso no desenvolvimento psicomotor, convulsões, microcefalia, comprometimento cognitivo, sintomas psiquiátricos, autismo (Blau et al., 2010; Williams et al., 2008).

O primeiro teste eficiente para o diagnóstico de PKU foi desenvolvido em 1962 por Robert Guthrie. O procedimento era baseado na inibição do crescimento da bactéria *Bacillus subtilis*, que requer o aminoácido fenilalanina

para o seu crescimento (Guthrie e Susi, 1963). O teste para triagem de PKU deve ser realizado nos primeiros dias de vida, para que se evitem os danos neurológicos por meio da imediata implementação da dieta restrita em fenilalanina. As técnicas utilizadas atualmente na detecção da doença, como espectrometria de massas in tandem, são muito sensíveis e específicas, permitindo a identificação simultânea de outros erros inatos do metabolismo (Blau et al., 2011).

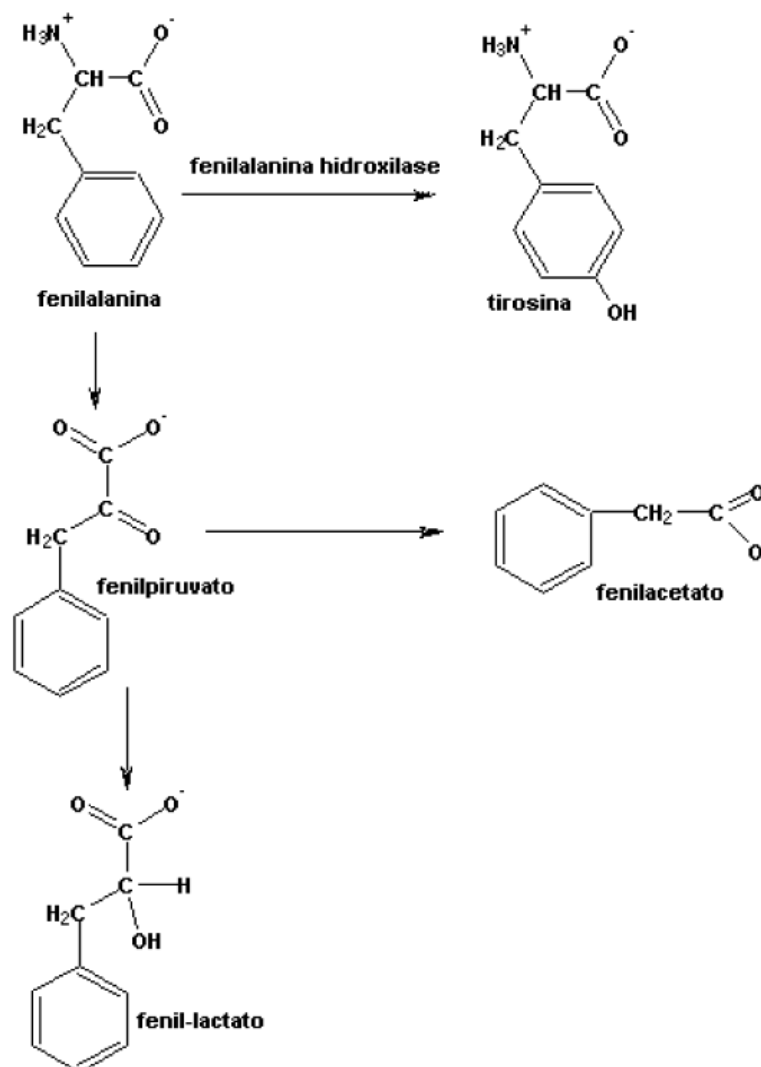


Figura 1. Catabolismo da fenilalanina (adaptado de Nyhan, 1984).

O principal tratamento para PKU consiste na restrição dietética de fenilalanina, de modo a manter os níveis plasmáticos do aminoácido abaixo das concentrações tóxicas. O diagnóstico precoce e o tratamento podem prevenir as consequências irreversíveis da doença, como o retardo mental (Casey, 2013). Entretanto, o manejo da dieta é difícil e a ingestão excessiva de fenilalanina, que ocorre principalmente durante a adolescência, pode resultar em dano ao sistema nervoso central, com episódios frequentes de dores de cabeça, irritabilidade e dificuldade de concentração (MacLeod e Ney, 2010; MacDonald et al., 2012). Alguns pacientes que seguem corretamente a dieta restrita em fenilalanina, sem nenhuma terapia adjuvante, apesar de não sofrerem as manifestações clínicas mais graves da PKU, apresentam anormalidades nas funções neurocognitivas. Assim, terapias adicionais à dieta podem representar uma importante alternativa para pacientes PKU (Enns et al., 2010; van Spronsen e Enns, 2010).

Concentrações plasmáticas elevadas de fenilalanina estão associadas à redução da biossíntese de proteínas cerebrais (Hoeksma et al., 2009; de Groot et al., 2013), já que os outros aminoácidos – como tirosina e triptofano - que utilizam o transportador de aminoácidos neutros na barreira hematoencefálica têm seu transporte reduzido pelos altos níveis de fenilalanina circulante (Pardridge, 1998; Surtees e Blau, 2000). Devido à deficiência cerebral de tirosina e triptofano, ocorre redução da biossíntese dos neurotransmissores dopamina, noradrenalina e serotonina (Surtees e Blau, 2000). Fenilalanina em excesso leva à inibição da biossíntese do colesterol, o que inviabiliza o

processo de mielinização pelos oligodendrócitos, comprometendo a condução de potenciais de ação (Shefer et al., 2000).

2. Radicais Livres

Radicaís livres são moléculas ou átomos formados pela perda ou pelo ganho de um elétron (Halliwell e Gutteridge, 2007). Assim, apresentam elétrons desemparelhados em sua camada de valência, o que lhes confere alta reatividade (Southorn e Powis, 1988). O termo espécies reativas de oxigênio (ERO) engloba tanto os radicaís livres formados pela redução do O_2 , com seus elétrons desemparelhados na última camada eletrônica, como também os não-radicaís, que apresentam estabilidade de elétrons, a exemplo do H_2O_2 e do ácido hipocloroso (HOCl) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Durante a respiração celular, o oxigênio molecular sofre redução tetravalente ao final da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, formando água. A incompleta redução do oxigênio nesse processo resulta na formação de ERO, dentre as quais o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila (OH^{\cdot}), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o hidroperoxila (HO_2^{\cdot}) (Cohen, 1989).

Os radicaís livres são necessários em determinados processos fisiológicos, como na regulação do diâmetro vascular e na proliferação celular (Ďuračková, 2010). Além disso, ERO estão envolvidas na sinalização do processo de apoptose (Bae et al., 2011; Ray et al., 2012). Entretanto, as espécies reativas também participam de processos patológicos do organismo.

Quando ocorre um desequilíbrio entre a taxa de produção de espécies reativas e a capacidade dos mecanismos celulares para consumi-las, as espécies reativas passam a causar danos a proteínas, lipídios e DNA (Halliwell e Whiteman, 2004; Liu et al., 2011).

3. Sistema de Defesa Antioxidante

As células dispõem de um sistema de defesa antioxidante para evitar os efeitos deletérios das espécies reativas, o qual pode ser classificado como enzimático e não-enzimático. Dentre as enzimas do sistema de defesa antioxidante, pode-se citar a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), as quais são essenciais para a detoxificação das ERO. Nas defesas não enzimáticas, incluem-se os antioxidantes hidrofílicos (ácido ascórbico, glutathione, indóis e catecóis) e os lipofílicos (carotenóides, tocoferóis e bioflavonóides) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A metaloenzima SOD catalisa a reação de dismutação do ânion radical superóxido, gerando peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. O produto peróxido de hidrogênio - também uma espécie reativa de oxigênio, porém menos reativa que o ânion radical superóxido - é posteriormente neutralizado por outros sistemas, como as enzimas CAT e GPx (Fridovich, 1975).

A CAT, uma heme proteína, catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio molecular (Ferreira e Matsubara, 1997). Outra enzima que também degrada peróxido de hidrogênio é a GPx. Nessa reação, a decomposição do peróxido de hidrogênio e de peróxidos orgânicos é acoplada

à oxidação da glutathiona reduzida, que atua como doadora de elétrons, formando glutathiona oxidada. A glutathiona oxidada que se forma pela reação da GPx é reciclada novamente a glutathiona reduzida por ação da enzima glutathiona redutase (GR). Nessa reação, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) atua como coenzima (Chance et al., 1979).

4. Estresse Oxidativo

O adequado controle entre a formação de ERO e de nitrogênio e sua remoção pelo sistema de defesa antioxidante enzimático e não-enzimático garante um estado fisiológico normal ao organismo. O estresse oxidativo ocorre quando a produção de ERO supera a capacidade das defesas antioxidantes celulares, desencadeando dano oxidativo a DNA, lipídios, proteínas, carboidratos (Halliwell e Gutteridge, 2007; Gutowski e Kowalczyk, 2013).

Em uma situação de estresse oxidativo, as consequências podem estar relacionadas a dano celular, com comprometimento de biomoléculas; morte celular, quando os mecanismos de reparo são insuficientes para a recuperação, ocorrendo apoptose ou necrose; ou adaptação, quando a célula aumenta seus sistemas de defesa, resistindo à injúria (Halliwell e Whiteman, 2004).

O sistema nervoso central é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo. Isso ocorre porque, nesse sistema, as defesas antioxidantes são limitadas, existe alta demanda de oxigênio e níveis elevados de ferro, além de

haver elevado conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados, que são altamente sensíveis aos radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Têm-se demonstrado que, em desordens neurodegenerativas (Hsieh e Yang, 2013; Li et al., 2013) como as doenças de Parkinson e Alzheimer (Behl e Moosmann, 2002), o estresse oxidativo está envolvido na patogênese das doenças. Em modelos animais de erros inatos do metabolismo, as evidências também têm demonstrado o possível envolvimento do estresse oxidativo, como na Doença de Canavan (Pederzoli et al., 2010), na tirosinemia (Sgaravatti et al., 2008; Sgaravatti et al., 2009), na Doença da Urina do Xarope do Bordo (Mescka et al., 2011) e na homocistinúria (da Cunha et al., 2011).

4.1. Estresse Oxidativo e Fenilcetonúria

Os mecanismos neurofisiopatológicos precisos da PKU ainda não foram completamente elucidados. Entretanto, tem-se verificado que o estresse oxidativo pode ter participação nesta doença, tanto pela diminuição de defesas antioxidantes, quanto pelo aumento da produção de ERO (Ercal et al., 2002; Wajner et al., 2004). Além disso, em pacientes fenilcetonúricos, a magnitude do dano oxidativo pode estar relacionada à extensão do aumento dos níveis plasmáticos de fenilalanina (Sanayama et al., 2011).

Em modelos animais de HPA, verificou-se lipoperoxidação no cérebro e alterações nas defesas antioxidantes enzimáticas tanto em experimentos *in vitro* quanto *in vivo* (Ercal et al., 2002; Moraes et al., 2010; Mazzola et al., 2011). Também se verifica, em pacientes, aumento de lipoperoxidação,

alterações na atividade de enzimas das defesas antioxidantes, e redução das defesas antioxidantes não enzimáticas (Sirtori et al., 2005; Sanayama et al., 2011). Em pacientes fenilcetonúricos não diagnosticados precocemente e com exposição a altos níveis de fenilalanina por um longo período de tempo, foram observadas alterações em parâmetros de estresse oxidativo no plasma e nos eritrócitos (Sitta et al., 2009). Soma-se a isso, em pacientes com diagnóstico precoce e seguindo a dieta restrita em fenilalanina, a possível relação entre o estresse oxidativo e o comprometimento de funções cognitivas (Gassio et al., 2008).

A dieta restritiva na PKU pode levar à deficiência de nutrientes necessários ao sistema de defesa antioxidante, de modo a prejudicar o status oxidativo nesses pacientes (Artuch et al., 2004). Verificou-se, em crianças e adolescentes com PKU, níveis deficientes de selênio e de zinco (Barretto et al., 2008). Ainda, verificou-se em pacientes com PKU deficiência de Q10, a qual está associada aos níveis elevados de fenilalanina circulante (Colomé et al., 2002). Em um estudo com modelo animal de HPA, em que se observou o aumento de marcadores de estresse oxidativo, o tratamento com melatonina e com as vitaminas E e C foi capaz de reverter o dano induzido em cerebelo de filhotes de ratos (Martinez-Cruz et al., 2002). A administração de ácido lipoico (Moraes et al., 2010) e o exercício físico regular (Mazzola et al., 2011) também foram capazes de prevenir o dano oxidativo no cérebro de ratos em modelo de HPA. A suplementação com L-carnitina e com selênio foi eficiente na redução do estresse oxidativo em pacientes com PKU (Sitta et al., 2011). Dessa maneira, a utilização de novas estratégias antioxidantes para a terapia de PKU

tem se mostrado importante visto que as evidências demonstram o envolvimento do estresse oxidativo nesta patologia.

5. Silibinina

A silibinina (Sil) é uma flavolignana presente nas sementes de *Silybum marianum* (cardo de leite), a qual tem sido utilizada milenarmente para o tratamento de problemas gastrointestinais e hepáticos (Křen e Walterová, 2005). Têm-se demonstrado que a Sil parece ser promissora no tratamento de diversos distúrbios, como diabetes (Marrazzo et al., 2011), câncer (Duan et al., 2010), doenças pulmonares (Mateen et al., 2013), hepáticas (Loguercio e Festi, 2011) e renais (Sonnenbichler et al., 1999). Após administração, esta molécula é amplamente distribuída pelos tecidos (Zhao e Agarwal, 1999).

A Sil apresenta potente ação antioxidante, neutralizando radicais livres tais como o radical hidroxila (Mira et al., 1994; Trouillas et al., 2008), o que contribui para seu mecanismo de ação hepatoprotetor (De Groot e Rauen, 1998). Além disso, tem a propriedade de quelar íons ferro (Borsari et al., 2001). Esta substância levou ao aumento da atividade da SOD em eritrócitos (Müzes et al., 1991), e inibição da lipoperoxidação em microsomas de fígado de ratos e em hepatócitos isolados (Bosisio et al., 1992; Mira et al., 1994).

Em um estudo em que se induziu a neurotoxicidade em camundongos pela administração do peptídeo beta-amiloide, a redução dos níveis de glutathiona e o aumento da lipoperoxidação no hipocampo foram prevenidos pelo tratamento com Sil (Lu et al., 2009). Ainda, o tratamento com Sil aumentou

a resistência celular contra o dano oxidativo, apresentando efeito neuroprotetor em camundongos diabéticos (Marrazzo et al., 2011).

Em muitos erros inatos do metabolismo, incluindo PKU, tem-se investigado a utilização de estratégias concomitantes à terapia convencional com o intuito de melhorar o quadro clínico dos pacientes (Sitta et al., 2011; Mescka et al., 2013). Assim, o antioxidante Sil apresenta-se como potencial agente a ser investigado para o controle do estresse oxidativo observado na PKU.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Investigar a prevenção, pela Sil, dos efeitos *in vitro* e *in vivo* da fenilalanina sobre parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos.

Objetivos Específicos:

- 1) Avaliar, *in vitro*, a condição redox de homogeneizado de córtex cerebral de ratos incubados com fenilalanina e Sil, verificando-se parâmetros de defesas antioxidantes enzimáticas, danos protéicos e lipídicos, e a produção inespecífica de espécies reativas.
- 2) Avaliar o efeito da Sil em córtex cerebral de ratos jovens submetidos ao modelo agudo de HPA sobre os mesmos parâmetros do estudo *in vitro*.

Parte II

Artigo submetido

***SILIBININ PREVENTS OXIDATIVE STRESS IN THE CEREBRAL CORTEX
OF HYPERPHENYLALANINEMIC RATS***

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

Manuscript Draft

Data de submissão: 19/03/2014

Silibinin prevents oxidative stress in the cerebral cortex of hyperphenylalaninemic rats

Melaine Terra^b, Giovana Reche Dalazen^b, Carlos Eduardo Diaz Jacques^a, Juliana G. Coelho^b, Raylane Freitas^b, Priscila Nicolao Mazzola^b, Carlos Severo Dutra-Filho^{a,b*}

^aDepartamento de Bioquímica and ^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS – Brazil

*Corresponding Author

Address Correspondence to:

Carlos Severo Dutra-Filho

Departamento de Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo

Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

E-mail: dutra@ufrgs.br

Telephone number: +55 51 33085575

Fax number: +55 51 33085535

Abstract Phenylketonuria (PKU) is a metabolic disorder caused by a deficiency of phenylalanine hydroxylase, leading to accumulation of phenylalanine. Neuropsychological impairment and developmental retardation are the main clinical features of non-treated PKU patients. Oxidative stress has been related to many inborn errors of metabolism including PKU. Silibinin is a flavolignan derived from the herb milk thistle (*Silybum marianum*) which presents antioxidant properties and is widely distributed into tissues after administration. In the present study, we investigated the *in vivo* and *in vitro* effects of silibinin against oxidative stress caused by high levels of phenylalanine. To produce hyperphenylalaninemia, young rats received injections of α -methylphenylalanine and phenylalanine. To perform *in vitro* experiments, cerebral cortex homogenates of young rats were incubated with phenylalanine. Silibinin was able to prevent the inhibition provoked by phenylalanine on the activities of catalase, glutathione peroxidase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. No differences were found among the groups in the activities of superoxide dismutase and glutathione reductase. Moreover, silibinin prevented the alterations provoked by phenylalanine on protein carbonyl content, thiobarbituric acid-reactive substances and production of reactive species. Silibinin prevented oxidative damage induced by phenylalanine and may be a potential adjuvant therapy to PKU treatment.

Keywords Phenylketonuria · Hyperphenylalaninemia · Oxidative stress · Antioxidant · Silibinin

1. Introduction

Phenylketonuria (PKU) is an inherited metabolic disease characterized by a deficiency of phenylalanine hydroxylase (EC 1.14.16.1), an enzyme which converts phenylalanine (Phe) into tyrosine. When untreated, PKU results in accumulation of Phe and its metabolites phenylpyruvate, phenylactate and phenylacetate (Scriver and Kaufman 2001). This accumulation in the blood and tissues is harmful, leading to neuropsychological impairment (Blau et al. 2010), but the mechanisms by which this occurs are not totally clear (Gropman 2012). Birth prevalence of PKU is 1:14,000 (Wilcken and Wiley 2008). The early diagnosis and treatment can prevent the long-term consequences of the disease, including mental retardation (Casey 2013). Phenylalanine dietary restriction is necessary to maintain plasma Phe below toxic concentrations. Nevertheless, nutritional management is difficult and noncompliance to the PKU diet may result in neurological deterioration (MacDonald et al. 2012; MacLeod and Ney 2010). In some patients, even if adequately treated with diet-alone therapy, neurocognitive functions present abnormalities. So, an adjunctive therapy could be helpful (Enns et al. 2010; van Spronsen and Enns 2010).

Reactive oxygen species are naturally formed in living systems, which have mechanisms capable to neutralize them. In physiological processes, such as regulation of vascular diameter and cell proliferation, free radicals are required (Ďuračková 2010). Oxidative stress occurs when the production of reactive oxygen species overcomes cellular antioxidant defenses, producing oxidative damage (Halliwell and Gutteridge 2007; Liu et al. 2011). Due to its high consumption of oxygen and the plenty of peroxidisable molecules, the brain is especially susceptible to oxidative stress (Gandhi and Abramov 2012).

Increasing evidence from animal models and patients suggests that oxidative stress might be involved in pathogenesis of PKU (Hagen et al. 2002; Mazzola et al. 2013; Vargas et al. 2011; Wajner et al. 2004). Also, the extent of oxidative damage is correlated with serum phenylalanine levels in PKU patients (Sanayama et al. 2011). Hyperphenylalaninemia (HPA) animal models induced lipid peroxidation in brain and alterations of enzymatic antioxidant defenses both *in vitro* and *in vivo* experiments (Ercal et al. 2002; Mazzola et al. 2011; Moraes et al. 2010). PKU patients with late diagnosis and long exposition to high Phe levels presented alterations of oxidative stress parameters in plasma and erythrocytes (Sitta et al. 2009).

Silibinin (Sil) is a flavolignan constituent of the seeds of milk thistle (*Silybum marianum*) used for the treatment of liver diseases (Gažák et al. 2007; Křen and Walterová 2005). This molecule has antioxidative and radical scavenging properties (Mira et al. 1994; Trouillas et al. 2008), which participate in hepatoprotective mechanism (De Groot and Rauen 1998). Sil has shown to increase superoxide dismutase activity in erythrocytes (Müzes et al. 1991), and inhibit lipid peroxidation in rat liver microsomes and isolated hepatocytes (Bosisio et al. 1992; Mira et al. 1994). In A β -induced neurotoxicity, the decrease in the level of glutathione and the accumulation of lipid peroxide in mice hippocampus was prevented by treatment with Sil (Lu et al. 2009). Moreover, silibinin treatment increased cell resistance against oxidative damage, providing effective neuroprotection in diabetic mice (Marrazzo et al. 2011).

In this paper, we aim to verify the antioxidative effect of Sil treatment in cerebral cortex of young rats submitted to a model of HPA and also *in vitro* conditions in medium with high levels of Phe.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and equipments

All chemicals were purchased from Sigma/Aldrich (St. Louis, MO, USA). A spectrophotometer Beckman DU[®]800 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA), and a SpectraMax M5/M5 Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA) were used for the measurements. For the centrifugation procedures, Eppendorf 5417R (refrigerated version) and Eppendorf 5403 were used.

2.2. Experimental design

Wistar rats of both sexes, bred in the Department of Biochemistry, UFRGS, were used according to sample size calculation with 80% power at the 0.05 level of significance (MiniTab[®]). Rats stayed with their dams until they were sacrificed. The dams had free access to water and to a standard commercial chow (Nuvilab, Porto Alegre, RS, Brazil). Temperature was maintained at $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, with a 12:12 h light/dark cycle. The Principles of Laboratory Animal Care (NIH publication # 80-23, revised 1996) were followed in all the experiments, and the research project was approved by the Ethical Committee for animal experimentation of the Federal University of Rio Grande do Sul. Animals received intraperitoneal injections (IP) of Sil (Marrazzo et al. 2011) from 12th to 14th day of life. To perform the model of HPA, subcutaneous injections (SC) of α -methylphenylalanine (α -MePhe) on the 13th day of life and Phe on the 14th day were administered (Hagen et al. 2002). The substances were dissolved in saline. Animals were distributed into four groups: Control group (saline solution SC and IP); Sil group

(20 mg/kg silibinin IP and saline solution SC); Phe group (1.6 $\mu\text{mol/g}$ $\alpha\text{-MePhe}$, 2.1 $\mu\text{mol/g}$ Phe SC and saline solution IP) and Sil + Phe group (1.6 $\mu\text{mol/g}$ $\alpha\text{-MePhe}$, 2.1 $\mu\text{mol/g}$ Phe SC and 20 mg/kg silibinin IP). All the animals were killed one hour after the last injection.

2.3. Tissue preparation

Animals were killed by decapitation without anesthesia and the brain was immediately removed. The olfactory bulbs, pons, cerebellum and medulla were discarded; cerebral cortex was dissected, weighted and kept chilled until homogenization. Cerebral cortex was homogenized 1:10 w/v in 20 mM sodium phosphate and 140 mM KCl (pH 7.4) buffer and centrifuged at 1,000 g for 10 min at 4°C, and the supernatant was immediately used for the measurements.

2.4. *In vitro* experiments

Fourteen-day-old rats were killed, had their cerebral cortex dissected, homogenized and centrifuged as described above. Cerebral cortex homogenates were incubated with Phe and Sil for 1 h at 37°C. The substances were diluted in 20 mM sodium phosphate and 140 mM KCl (pH 7.4) buffer, and the final concentrations in the incubation medium were the following: 10 mM Phe and 10, 20 and 40 μM Sil. The same buffer was added to controls instead of Phe at the same volumes.

2.5. Catalase (CAT) activity assay

CAT activity was assayed using a double-beam spectrophotometer with temperature control (Hitachi U-2001). This method is based on the disappearance of H₂O₂ at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H₂O₂, 0.1% Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 and 0.1-0.3 mg protein/mL (Aebi 1984). One CAT unit is defined as 1 μmol of hydrogen peroxide consumed/min and the specific activity is calculated as CAT units/mg protein.

2.6. Superoxide dismutase (SOD) activity assay

The assay of SOD activity was carried out as previous described (Marklund 1985). Cerebral tissue was homogenized 1:10 (w/v) in 50 mM Tris-HCl buffer containing 1 mM EDTA (pH 8.2). This method is based on capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on superoxide radical. The inhibition of autoxidation of this compound occurs in the presence of SOD, whose activity can be indirectly assayed spectrophotometrically at 420 nm, using a double-beam spectrophotometer with temperature control (Hitachi U-2001). A calibration curve was performed with purified SOD as standard. A 50% inhibition of pyrogallol autoxidation is defined as one unit of SOD and the specific activity is represented as units per mg protein.

2.7. Glutathione peroxidase (GPx) activity assay

GPx activity was measured using tert-butyl-hydroperoxide as substrate (Wendel 1981). NADPH disappearance was monitored at 340 nm using a double-beam spectrophotometer with temperature control (Hitachi U-2001). The medium contained 2 mM glutathione, 0.15 U/mL glutathione reductase, 0.4 mM azide, 0.5 mM tert-butyl-

hydroperoxide and 0.1 mM NADPH. One GPx unit is defined as 1 μ mol of NADPH consumed/min and the specific activity is represented as GPx units/mg protein.

2.8. Glutathione reductase (GR) activity assay

The assay of GR was carried out as described by Calberg and Manervick (1985). The method is based on glutathione oxidized (GSSG) reduction using NADPH as coenzyme. The medium contained 200 mM sodium phosphate buffer and 6.3 mM EDTA (pH 7.5), 10 mM GSSG and 0.4 mM NADPH. NADPH disappearance was monitored at 340 nm using SpectraMax M5/M5 Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA). One GR unit is defined as 1 μ mol of GSSG reduced per minute and the specific activity is represented as GR units/mg protein.

2.9. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity assay

To obtain the G6PD activity, two measurements were made separately: 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) activity alone and the total dehydrogenase activity (G6PD+6PGD). The difference obtained was assumed to be G6PD activity. Substrates for both dehydrogenase enzymes were added to a cuvette to obtain the total dehydrogenase activity, and the reaction mixture contained the following: 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM $MgCl_2$, 0.5 $NADP^+$, 1mM 6-phosphogluconate (6PGD substrate), 1 mM glucose-6-phosphate (G6PD substrate), and the sample. The same reaction mixture without glucose-6-phosphate was used in another cuvette to obtain the activity of 6PGD alone. G6PD activity was calculated by subtracting the activity of 6PGD from the total dehydrogenase activity ($G6PD = total - 6PGD$). The addition of 1 mM $NADP^+$

started the reactions, which was monitored in a spectrophotometer at 340 nm. One enzyme activity unit was defined as 1 μmol of substrate transformed per min, and the specific activity is represented as units/mg protein (Tian et al. 1994).

2.10. Protein carbonyl content

Oxidatively modified proteins present an enhancement of carbonyl content (Stadtman and Levine 2003). Here, protein carbonyl content was assayed by a method based on the reaction of protein carbonyls with dinitrophenylhydrazine forming dinitrophenylhydrazone, a yellow compound, measured spectrophotometrically at 370 nm (Reznick and Packer 1994). In brief, 400 μL of 10 mM dinitrophenylhydrazine, prepared in 2 M HCl, were added to 200 μL of sample. This mixture was kept in the dark for 1 h, and vortexed every 15 min. Then, 500 μL of 20% trichloroacetic acid was added, the mixture was vortexed and centrifuged at 20,000 g for 3 min. The supernatant obtained was discarded. The pellet was washed with 1 ml ethanol: ethyl acetate (1:1, v/v), vortexed, and centrifuged at 20,000 g for 3 min. After that, the supernatant was discarded and the pellet re-suspended in 600 μL of 6 M guanidine (prepared in a 20 mM potassium phosphate solution pH 2.3). The sample was vortexed and incubated at 60°C for 15 min. Subsequently, it was centrifuged at 20,000 g for 3 min, and the absorbance was measured at 370 nm (UV). The results were presented as protein carbonyl content (nmol/mg protein).

2.11. Thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS)

The TBA-RS was measured according to Ohkawa et al. (1979). In brief, reagents were added to glass tubes samples in the following order: 500 μL of tissue supernatant; 50 μL of SDS 8.1%; 1,500 μL of 20% acetic acid in aqueous solution (v/v) pH 3.5; 1,500 μL of 0.8% thiobarbituric acid; and 700 μL of distilled water. The resulting mixture was vortexed and the reaction was carried out in a boiling water bath for 1 h. The mixture was allowed to cool on water for 5 min, and was centrifuged at 750 g for 10 min. The resulting pink stained TBA-RS were determined spectrophotometrically at 532 nm. TBA-RS were calculated as nmol TBA-RS/mg protein.

2.12. 2',7'-dichlorofluorescein oxidation assay (DCF)

Reactive oxygen/nitrogen species production was measured following Lebel et al. method based on 2',7'-dichlorofluorescein (H_2DCF) oxidation (Lebel et al. 1992). Samples (30 μL) were incubated with 30 μL of 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 with 140 mM KCl and 240 μL of 100 μM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) solution for 30 min at 37°C in the dark. $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ is cleaved by cellular esterases and H_2DCF formed is eventually oxidized by reactive oxygen or nitrogen species presenting in samples. The last reaction produces the fluorescent compound DCF which was measured at 488 nm of excitation and 525 nm of emission. The results were represented by nmol DCF/mg protein.

2.13. Protein level determination

Protein was measured by the method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as standard.

2.14. Statistical analysis

Statistical analysis was performed by the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test for multiple comparisons when the F value was significant. All the analysis were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer. A value of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

3. Results

Concerning antioxidant enzymatic defenses, we analyzed the activities of CAT, SOD, GPx, GR and G6PD. Figure 1 shows that the CAT activity was reduced by the HPA model, and this effect was prevented by Sil ($F_{(3, 33)}=28.62$, $p < 0.05$); the result obtained *in vitro* revealed that 20 and 40 μM Sil were capable to prevent the inhibition on the activity of CAT caused by 10 mM Phe ($F_{(7, 46)}=18.77$, $p < 0.05$). The activity of SOD was not altered neither by the HPA nor by Sil ($F_{(3, 28)}=1.37$, $p > 0.05$); similarly, no differences among the groups were found *in vitro* ($F_{(7, 52)}=1.22$, $p > 0.05$) (Fig. 1). As shown in figure 2, Sil prevented the inhibition caused by HPA model on the activity of GPx ($F_{(3, 21)}=7.96$, $p < 0.05$); *in vitro*, the enzyme activity was reduced by 10 mM Phe and restored by 40 μM Sil ($F_{(7, 41)}=18.27$, $p < 0.05$). No differences among the groups were found of GR activity both *in vivo* and *in vitro* experiments ($F_{(3, 21)}=0.44$, $p > 0.05$ and $F_{(7, 38)}=0.21$, $p > 0.05$, respectively) (Fig. 2). G6PD activity was inhibited by HPA and this effect was prevented by Sil ($F_{(3, 20)}=6.80$, $p < 0.05$); *in vitro*, the activity of G6PD

was reduced by 10 mM Phe, and 10, 20 and 40 μ M Sil restored this activity ($F_{(7, 52)}=14.70$, $p<0.05$) (Fig. 2).

We also measured oxidative protein damage assessed by carbonyl content, lipid peroxidation by analyzing the TBA-RS levels and generation of unspecific reactive species by the DCF production (Fig. 3). HPA model increased carbonyl content, and this oxidative change was prevented by Sil treatment ($F_{(3, 20)}=13.15$, $p<0.05$); *in vitro*, all concentrations tested of Sil were able to prevent the increase of carbonyl content caused by 10 mM Phe ($F_{(7, 49)}=8.29$, $p<0.05$). TBA-RS levels were increased in the HPA model, and Sil was able to prevent this alteration ($F_{(3, 17)}=5.75$, $p<0.05$); *in vitro*, TBA-RS levels was diminished by exposure to 40 μ M Sil alone, increased by 10 mM Phe and 10, 20 and 40 μ M Sil returned TBA-RS to control levels ($F_{(7, 56)}=20.75$, $p<0.05$). DCF production was also increased by HPA, while Sil prevented this alteration ($F_{(3, 20)}=6.42$, $p<0.05$); similarly to TBA-RS results, DCF production *in vitro* was diminished by 40 μ M Sil alone, and all concentrations tested of Sil were able to prevent the increase of DCF caused by Phe ($F_{(7, 44)}=10.05$, $p<0.05$).

4. Discussion

In many recent studies, the pathological process underlying PKU has been associated to oxidative stress (Mazzola et al. 2013; Ribas et al. 2011; Sanayama et al. 2011; Sitta et al. 2009). Although protein dietary restriction therapy avoids mental retardation, cognitive impairments and oxidative stress may still exist in treated PKU patients (DeRoche and Welsh 2008; Sitta et al. 2006), which indicates the need of an adjunctive intervention. Also, the protein-restricted diet used to treat PKU can impair the antioxidant status of the patients because of nutritional deficiencies (van Bakel et al.

2000). In animal models of PKU, it has been observed that treatment with antioxidants is protective against oxidative damage in the brain (Martinez-Cruz et al. 2002; Moraes et al. 2010). Here, we investigated important oxidative stress parameters to verify the possible protective role of Sil against Phe toxicity *in vivo* and *in vitro*, in cerebral cortex of 14-day-old rats. The HPA model used here lead to Phe concentrations comparable to those found in PKU patients (Hagen et al. 2002), and a toxic concentration of Phe was used in the *in vitro* experiments.

CAT is an enzyme that decomposes hydrogen peroxide into water and molecular oxygen. A decrease of CAT activity was induced by HPA model; such effect has already been demonstrated (Moraes et al. 2010) and possibly leads to hydrogen peroxide accumulation. Sil was able to prevent CAT inhibition. The *in vitro* experiment shows that CAT activity was also inhibited in Phe group (Hagen et al. 2002), and 20 and 40 μM Sil prevented this inhibitory effect. Flavonoids, such as Sil, have shown to stabilize reactive oxygen species (Nijveldt et al. 2001), and scavenging hydrogen peroxide can be a possible mechanism by which Sil prevented the CAT inhibition. As observed by Hagen et al. (2002), the activity of SOD was not altered by HPA in the acute model or by Phe *in vitro*, and the antioxidant treatment did not alter SOD activity too. However, Müzes et al. (1991) found an increase in the activity of SOD in erythrocytes and lymphocytes of patients with liver disease in response to a treatment with silymarin, a standardized extract obtained from the seeds of *Silybum marianum* whose major component is Sil. The reason for this difference may be due to the different source of Sil used and also the different cell types analyzed. The enzyme GPx, which degrades hydrogen peroxide and other peroxides by using glutathione and selenium as cofactors, was inhibited by HPA and its activity was restored by Sil. A similar result was obtained *in vitro*: 40 μM Sil prevented the inhibitory effect caused by

Phe. Such results are in agreement with Moraes et al. (2010), who found that Phe inhibits GPx activity both *in vivo* and *in vitro*. Moreover, it was reported that silymarin causes an increase of glutathione content (Valenzuela et al. 1989). Considering that glutathione is an essential cofactor for GPx, we cannot rule out that Sil might have restored the enzyme activity by increasing glutathione levels. GR catalyzes the regeneration of glutathione from GSSG in the presence of NADPH. In the model of HPA and *in vitro*, no differences among the groups were found, suggesting that the inhibition on GPx activity caused by Phe is not likely due to an alteration on glutathione content related to GR activity. G6PD, the rate limiting enzyme of pentose phosphate pathway, is the main cellular source of NADPH, which has an important role for the antioxidant system. The G6PD activity was decreased by HPA and Phe *in vitro*, as reported by Moraes et al. (2010). Sil prevented this decrease in HPA and *in vitro* in all concentrations tested.

Next, we investigated the effect of HPA and Phe *in vitro* and the possible prevention by Sil on protein and lipid oxidation, and reactive species production in cerebral cortex of rats. Carbonyl content, which reflects protein oxidation, was increased by HPA, and Sil treatment was able to prevent this damage. The *in vitro* experiment showed the same profile, where 10, 20 and 40 μM Sil were able to prevent the increase in protein oxidation caused by Phe. Previous results have already shown protein oxidative damage in the plasma of PKU patients (Sitta et al. 2009). Lipid peroxidation, a process that generates malondialdehyde among other products, was assessed by TBA-RS. It has already observed that lipid peroxidation occurs in PKU patients (Sitta et al. 2009). Sil prevented the increase of TBA-RS caused by HPA and Phe *in vitro*. Also, 40 μM Sil itself caused a significant reduction in this parameter compared to the control group. In this scenario, Lu et al. (2009) found that Sil prevented

the accumulation of malondialdehyde in the hippocampus of mice submitted to A β -induced neurotoxicity. Non-specific reactive species production was assessed by DCF. Both *in vitro* and *in vivo*, an increase in DCF fluorescence intensity was induced by Phe, in accordance to the results of Moraes et al. (2010). Sil was capable to prevent the increase of DCF caused by Phe and 40 μ M Sil itself showed significantly lower levels of DCF than those of the control group. Considering that Sil exhibits high free radical-scavenging capacity (Trouillas et al. 2008), its protective effects on protein damage, lipid peroxidation and reactive species production might be related to the Sil ability of neutralizing reactive compounds.

Oxidative stress stands for an imbalance between the anti- and pro-oxidant systems, in favor of accumulation of reactive species, thus resulting in oxidative damage to biomolecules. Antioxidants may act by modulating reactive species metabolism at different levels (Halliwell 2006). The antioxidant Sil is considered to be very safe due to its low toxicity, good tolerance as a therapeutic agent and it is known to increase glutathione content (Valenzuela et al. 1989), chelate metals (Borsari et al. 2001), neutralize free radicals and inhibit lipid peroxidation (De Groot and Rauen 1998). Altogether, these mechanisms increase the redox state and protect cells against oxidative stress.

5. Conclusions

In this study, oxidative stress was induced in cerebral cortex of Wistar rats by HPA and Phe *in vitro*, altering antioxidant enzymatic defenses and damaging biomolecules. This is in agreement with results obtained from patients with PKU (Sanayama et al. 2011; Sirtori et al. 2005). Sil was capable to prevent the effects on oxidative stress caused by

HPA and Phe, by improving the activity of antioxidant enzymes, decreasing lipid and protein damage and reducing reactive species production (Fig. 4). The results presented here indicate that Sil might be useful as a coadjuvant therapy to PKU treatment in addition to the phenylalanine-restricted diet, providing a potential improvement in the redox status of the patients. More studies are necessary to clearly define the mechanisms by which Sil exerts its effects as well as to confirm the clinical benefits of this coadjuvant intervention in PKU.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the research grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and PROPESQ/UFRGS.

References

Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. Meth Enzymol 105:121-126

Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL (2010) Phenylketonuria. Lancet 376:1417-1427

Borsari M, Gabbi C, Ghelfi F, Grandi R, Saladini M, Severi S, et al. (2001) Silybin, a new iron-chelating agent. J Inorg Biochem 85:123-129

Bosisio E, Benelli C, Pirola O (1992) Effect of the flavanolignans of *Silybum marianum* L. on lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes. Pharmacol Res 25:147-154

Calberg I, Manervick B (1985) Glutathione reductase. Meth Enzymol 113:484-490

Casey L (2013) Caring for children with phenylketonuria. Can Fam Physician 59:837-840

Enns GM, Koch R, Brumm V, Blakely E, Suter R, Jurecki E (2010) Suboptimal outcomes in patients with PKU treated early with diet alone: revisiting the evidence. Mol Genet Metab 101:99-109

De Groot H, Rauen U (1998) Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. Fundam Clin Pharmacol 12:249-255

DeRoche K, Welsh M (2008) Twenty-five years of research on neurocognitive outcomes in early-treated phenylketonuria: intelligence and executive function. *Dev Neuropsychol* 33:474-504

Ďuračková Z (2010) Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res* 59:459-469

Ercal N, Aykin-Burns N, Gurer-Orhan H, McDonald JD (2002) Oxidative stress in a phenylketonuria animal model. *Free Radic Biol Med* 32:906-911

Gandhi S, Abramov AY (2012) Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev*. doi:10.1155/2012/428010

Gažák R, Walterová D, Křen V (2007) Silybin and silymarin – new and emerging applications in medicine. *Curr Med Chem* 14:315-338

Gropman AL (2012) Patterns of brain injury in inborn errors of metabolism. *Semin Pediatr Neurol* 19:203-210

Hagen MEK, Pederzoli CD, Sgaravatti AM, Bridi R, Wajner M, Wannmacher CM, et al. (2002) Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. *Biochim Biophys Acta* 1586:344-352

Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141:312-322

Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, New York

Křen V, Walterová D (2005) Silybin and silymarin – new effects and applications. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 149:29-41

Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. Chem Res Toxicol 5:227-231

Liu J, Litt L, Segal MR, Kelly MJS, Pelton JG, Kim M (2011) Metabolomics of oxidative stress in recent studies of endogenous and exogenously administered intermediate metabolites. Int J Mol Sci 12:6469-6501

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

Lu P, Mamiya T, Lu LL, Mouri A, Zou LB, Nagai T, et al. (2009) Silibinin prevents amyloid β peptide-induced memory impairment and oxidative stress in mice. Br J Pharmacol 157:1270-1277

MacDonald A, van Rijn M, Feillet F, Lund AM, Bernstein L, Bosch AM, et al. (2012) Adherence issues in inherited metabolic disorders treated by low natural protein diets. Ann Nutr Metab 61:289-295

MacLeod EL, Ney DM (2010) Nutritional management of phenylketonuria. *Ann Nestlé* 68: 58-69

Marklund SL (1985) Pyrogallol Autoxidation. In: Greenwald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research*, pp 243-247

Marrazzo G, Bosco P, La Delia F, Scapagnini G, Di Giacomo C, Malaguarnera M, et al. (2011) Neuroprotective effect of silibinin in diabetic mice. *Neurosci Lett* 504:252-256

Martinez-Cruz F, Pozo D, Osuna C, Espinar A, Marchante C, Guerrero JM (2002) Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: prevention by melatonin, vitamin E and Vitamin C. *J Neurosci Res* 69:550-558

Mazzola PN, Karikas GA, Schulpis KH, Dutra-Filho CS (2013) Antioxidant treatment strategies for hyperphenylalaninemia. *Metab Brain Dis* 28:541-550

Mazzola PN, Terra M, Rosa AP, Mescka CP, Moraes TB, Piccoli B, et al. (2011) Regular exercise prevents oxidative stress in the brain of hyperphenylalaninemic rats. *Metab Brain Dis* 26:291-297

Mira L, Silva M, Manso CF (1994) Scavenging of reactive oxygen species by silibinin dihemisuccinate. *Biochem Pharmacol* 48:753-759

Moraes TB, Zanin F, da Rosa A, Oliveira A, Coelho J, Petrillo F, et al. (2010) Lipoic acid prevents oxidative stress *in vitro* and *in vivo* by an acute hyperphenylalaninemia chemically-induced in rat brain. *J Neurol Sci* 292:89-95

Müzes G, Deák G, Láng I, Nékám K, Gergely P, Fehér J (1991) Effect of the bioflavonoid silymarin on the *in vitro* activity and expression of superoxide dismutase (SOD) enzyme. *Acta Physiol Hung* 78:3-9

Nijveldt R, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PAM (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74:418-425

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-358

Reznick AZ, Packer L (1994) Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Meth Enzymol* 233:357-363

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

Sanayama Y, Nagasaka H, Takayanagi M, Ohura T, Sakamoto O, Ito T, et al. (2011) Experimental evidence that phenylalanine is strongly associated to oxidative stress in adolescents and adults with phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 103:220-225

Scriver CR, Kaufman S (eds) (2001) Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency, vol II. The metabolic & molecular inherited disease. Mc-Graw-Hill, New York

Sirtori LR, Dutra-Filho CS, Fitarelli D, Sitta A, Haeser A, Barschak AG, et al. (2005) Oxidative Stress in patients with phenylketonuria. *Biochim Biophys Acta* 1740:68-73

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

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

Stadtman ER, Levine RL (2003) Free-radical mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25:207-218

Tian WN, Pignatari JN, Stanton RC (1994) Signal transduction proteins that associate with the platelet-derived growth factor (PDGF) receptor mediate the PDGF-induced release of glucose-6-phosphate dehydrogenase from permeabilized cells. *J Biol Chem* 269:14798-14805

Trouillas P, Marsal P, Svobodová A, Vostálová J, Gažák R, Hrbáč J, et al. (2008) Mechanism of the antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin flavolignans: a joint experimental and theoretical study. *J Phys Chem A* 112:1054-1063

Valenzuela A, Aspillaga M, Vial S, Guerra R (1989) Selectivity of silymarin on the increase of the glutathione content in different tissues of the rat. *Planta Med* 55:420-422

van Backel MME, Printzen G, Wermuth B, Wiesmann UN (2000) Antioxidant and thyroid hormone status in selenium-deficient phenylketonuric and hyperphenylalaninemic patients. *Am J Clin Nutr* 72:976-981

van Spronsen FJ, Enns GM (2010) Future treatment strategies in phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 99:S90-S95

Vargas CR, Wajner M, Sitta A (2011) Oxidative stress in phenylketonuric patients. *Mol Genet Metab* 104:S97-S99

Wajner M, Latini A, Wyse ATS, Dutra-Filho CS (2004) The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J Inher Metab Dis* 27:427-448

Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Meth Enzymol* 77:325-333

Wilcken B, Wiley V (2008) Newborn screening. *Pathology* 40:104-115

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 *In vivo* and *in vitro* effects of silibinin (Sil) on catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities in cerebral cortex from young rats subjected to HPA conditions. Results are mean \pm SD (n=6-10). * p <0.05 compared to control (Tukey test)

Fig. 2 *In vivo* and *in vitro* effects of silibinin (Sil) on glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activities in cerebral cortex from young rats subjected to HPA conditions. Results are mean \pm SD (n=5-8). * p <0.05 compared to control (Tukey test)

Fig. 3 *In vivo* and *in vitro* effects of silibinin (Sil) on protein carbonyl content (Carbonyls), on the production of thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) and on the production of reactive species (DCF) in cerebral cortex from young rats subjected to HPA conditions. Results are mean \pm SD (n=5-8). * p <0.05 compared to control (Tukey test)

Fig. 4 Effects of silibinin on oxidative stress parameters in cerebral cortex from young rats subjected to HPA conditions. (\uparrow means increase of the parameter by HPA and phenylalanine; \downarrow means decrease of the parameter by HPA and phenylalanine; = means prevention by silibinin). SOD superoxide dismutase, CAT catalase, GPx glutathione peroxidase, GR glutathione reductase, G6PD glucose-6-phosphate dehydrogenase, Carbonyls protein carbonyl content, DCF 2',7'-dichlorofluorescein oxidation, TBA-RS thiobarbituric acid-reactive substances. The figure was produced using Servier Medical Art (www.servier.com)

Figure 1

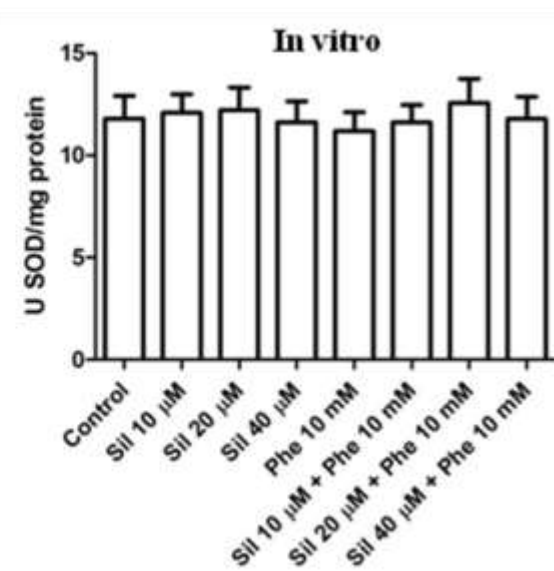
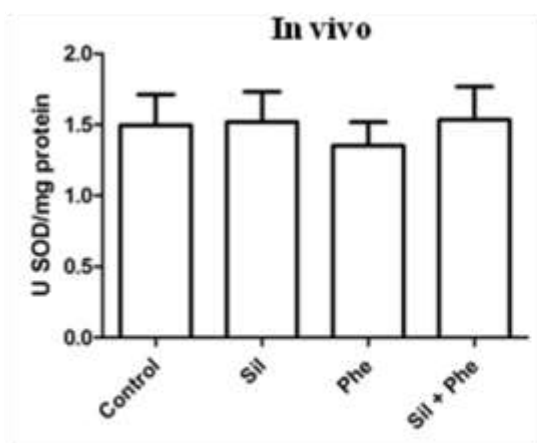
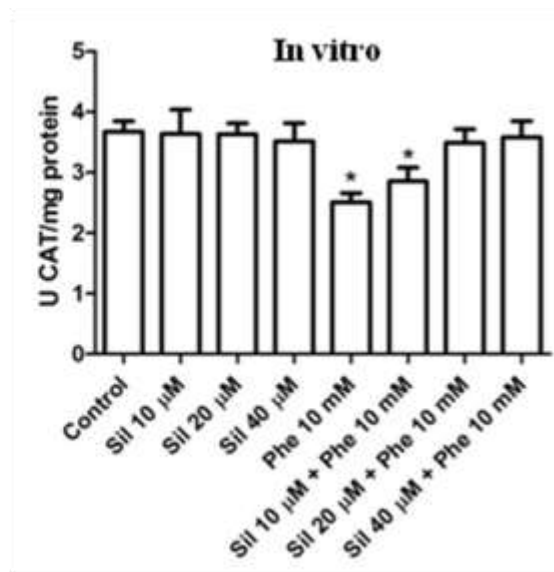
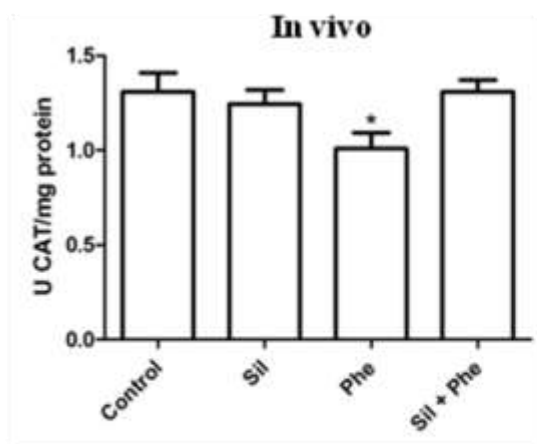


Figure 2

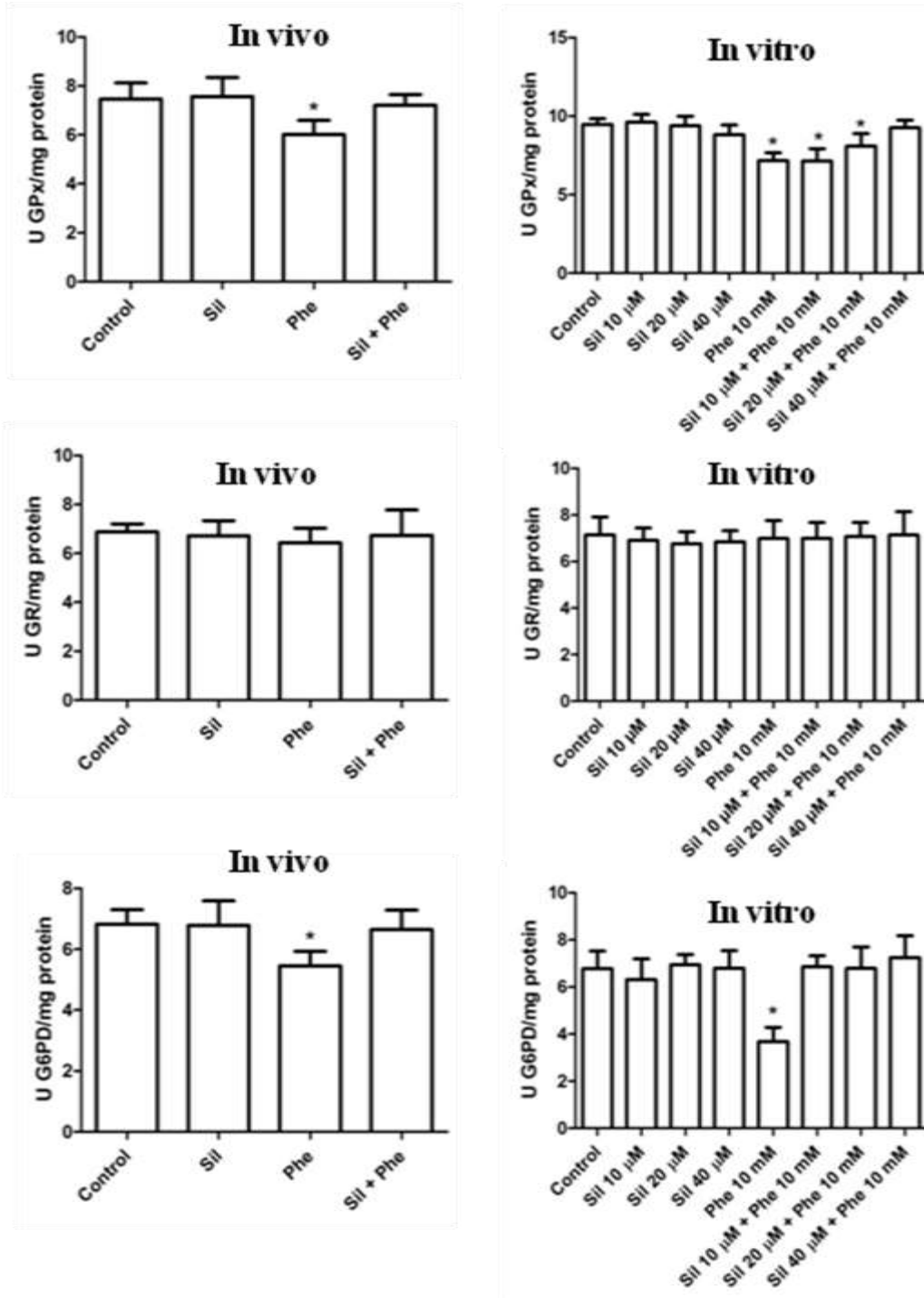


Figure 3

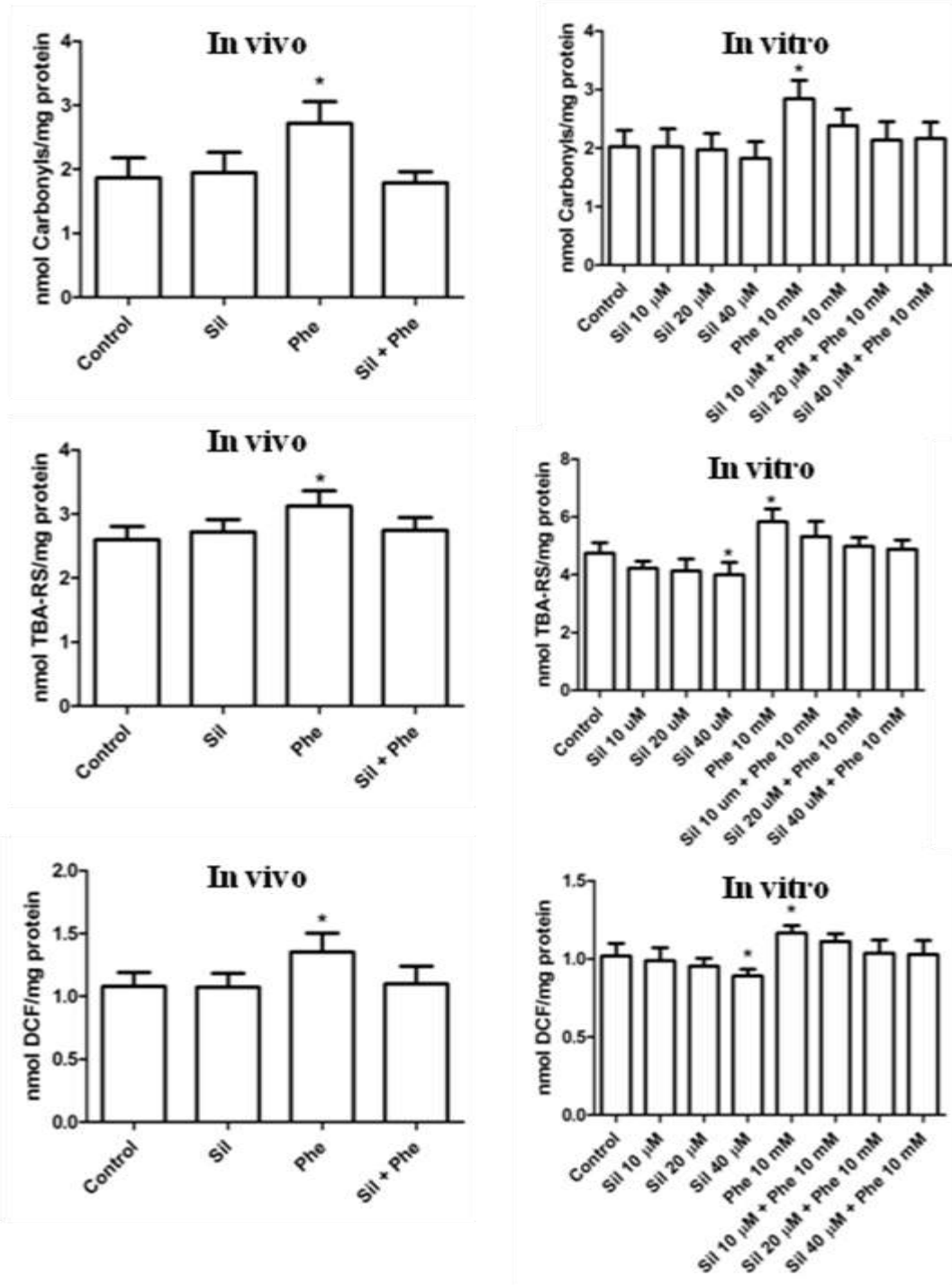
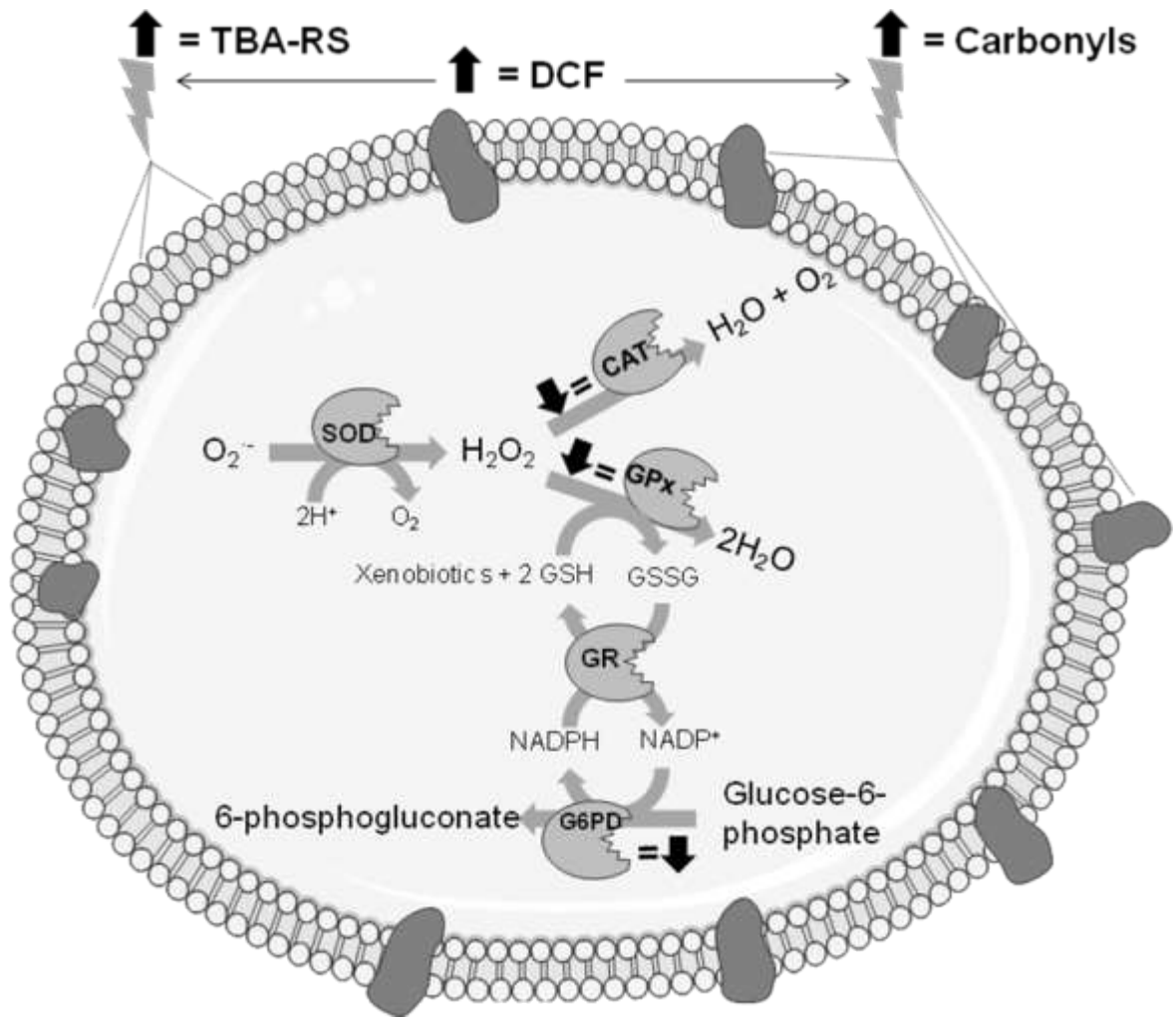


Figure 4



Parte III

DISCUSSÃO

Alterações no equilíbrio redox têm sido descritas na PKU, e o excesso de fenilalanina parece estar relacionado com o comprometimento do sistema de defesa antioxidante e com o aumento na produção de ERO. Dessa forma, o estresse oxidativo está possivelmente envolvido na fisiopatologia da doença (Sierra et al., 1998; Wajner et al., 2004; Sanayama et al., 2011). O principal tratamento da PKU, que consiste na dieta restrita em proteínas, pode modificar o status antioxidante dos pacientes devido à deficiência de micronutrientes (van Bakel et al., 2000). Estresse oxidativo, e, além disso, alterações nas funções cognitivas podem estar presentes mesmo em pacientes que sigam de maneira adequada a dieta restritiva em fenilalanina (Sitta et al., 2006; DeRoche e Welsh, 2008), o que evidencia a necessidade de uma terapia adicional.

O modelo de HPA utilizado é capaz de alterar parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos, conforme demonstrado em estudos anteriores (Hagen et al., 2002; Moraes et al., 2010; Mazzola et al., 2011). A formação de ERO ocorre principalmente durante a fosforilação oxidativa, nas mitocôndrias, e também por algumas enzimas e rotas metabólicas (Balaban et al., 2005). Nos modelos animais de PKU, têm-se observado que o tratamento com antioxidantes exerce efeito protetor contra o dano oxidativo no sistema nervoso central (Martinez-Cruz et al., 2002; Moraes et al., 2010).

No presente trabalho, foram investigados importantes parâmetros de estresse oxidativo para verificar o possível papel protetor da Sil contra a

toxicidade da fenilalanina *in vitro* e *in vivo*, analisando-se o córtex cerebral de ratos de 14 dias de vida. O modelo utilizado leva a concentrações de fenilalanina comparáveis às encontradas em pacientes fenilcetonúricos (Hagen et al., 2002), e uma concentração tóxica de fenilalanina foi utilizada nos experimentos *in vitro*.

Foram analisadas, inicialmente, as defesas antioxidantes enzimáticas. A CAT catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, e teve sua atividade inibida *in vitro* no grupo fenilalanina e no modelo HPA. Este efeito já havia sido demonstrado anteriormente (Moraes et al., 2010), e leva, possivelmente, ao acúmulo de peróxido de hidrogênio. A redução da atividade da CAT foi prevenida pela Sil. Os flavonóides, como Sil, apresentam a capacidade de estabilizar ERO (Nijveldt et al., 2001), e o sequestro de peróxido de hidrogênio é um possível mecanismo pelo qual a Sil preveniu a inibição da CAT. Como observado por Hagen et al. (2002), a atividade da SOD não foi alterada nem pela fenilalanina *in vitro*, tampouco pelo modelo agudo de HPA. O tratamento antioxidante também não resultou em alterações na atividade da SOD. Entretanto, Müzes et al. (1991) verificaram um aumento na atividade da SOD em eritrócitos e linfócitos de pacientes com doença hepática em resposta ao tratamento com silimarina, um extrato padronizado obtido das sementes de *Silybum marianum*, cujo componente majoritário é a Sil. A razão para esta diferença pode estar relacionada à diferente fonte de Sil utilizada e também aos diferentes tipos celulares estudados.

A enzima GPx, que utiliza glutatona e selênio como cofatores para degradar o peróxido de hidrogênio e outros peróxidos, teve sua atividade

inibida tanto *in vitro*, pela fenilalanina, quanto *in vivo*, pelo modelo HPA. A atividade enzimática foi restabelecida pelo tratamento com Sil. Estes resultados estão de acordo com Moraes et al. (2010), que verificou que a fenilalanina inibe a atividade da GPx tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Além disso, a silimarina causa um aumento no conteúdo de glutathiona (Valenzuela et al., 1989). Considerando que a glutathiona é um cofator essencial para a GPx, é possível que a Sil tenha restaurado a atividade da enzima pelo aumento dos níveis de glutathiona. No sistema nervoso central, CAT e GPx atuam de maneira cooperativa, evitando o aumento de seu substrato comum (Baud et al., 2004). Assim, é possível que, ao terem suas atividades restauradas pela Sil, as duas enzimas tenham sido importantes para o controle do aumento prejudicial de peróxido de hidrogênio. A enzima GR catalisa a regeneração da glutathiona, a partir de sua forma oxidada, na presença de NADPH. *In vitro* e no modelo HPA, não foram encontradas diferenças entre os grupos, sugerindo que a inibição da atividade da GPx causada pela fenilalanina não foi devido a alguma alteração no conteúdo de glutathiona catalisada pela GR. G6PD, a enzima limitante da via das pentoses fosfato, é a principal fonte celular de NADPH, que possui um papel essencial para o sistema antioxidante. Ocorreu inibição da atividade da G6PD pela fenilalanina *in vitro* e pelo modelo de HPA, como já descrito por Moraes et al. (2010). Sil foi capaz de prevenir a redução da atividade da enzima tanto *in vitro* quanto no modelo HPA.

Após, investigou-se o efeito da fenilalanina *in vitro* e do modelo HPA e a possível prevenção pela Sil da oxidação protéica e lipídica, além da produção de espécies reativas, no córtex cerebral dos ratos. O conteúdo de carbonilas,

que reflete a oxidação proteica, mostrou-se aumentado *in vitro* no grupo fenilalanina e *in vivo* no modelo HPA. O dano foi prevenido pelo tratamento com Sil nos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Estudos anteriores já haviam demonstrado que, em pacientes fenilcetonúricos, ocorre um aumento do dano oxidativo a proteínas plasmáticas (Sitta et al., 2009).

Para avaliar dano oxidativo a lipídios, verificou-se o conteúdo de TBA-RS, o qual é um conhecido marcador de lipoperoxidação e detecta produtos deste processo, como o malondialdeído. Os resultados obtidos neste estudo mostraram aumento de TBA-RS nos experimentos *in vitro*, pela fenilalanina, e *in vivo*, pelo modelo HPA. Em pacientes com PKU, também se verifica o aumento da lipoperoxidação (Sirtori et al., 2005; Sitta et al., 2009). O antioxidante Sil foi capaz de prevenir o aumento de TBA-RS *in vitro* e *in vivo*. A maior concentração de Sil testada *in vitro*, 40 μM , causou, por si só, uma redução significativa deste parâmetro quando comparada ao grupo controle. Neste cenário, Lu et al. (2009) relataram que a Sil preveniu o acúmulo de malondialdeído no hipocampo de camundongos submetidos à neurotoxicidade induzida pelo peptídeo beta-amiloide.

Por último, analisou-se a formação de 2',7' diclorofluoresceína (DCF), que representa um índice inespecífico de produção de espécies reativas. Tanto *in vitro* quanto *in vivo*, um aumento da intensidade da fluorescência de DCF foi induzido pela fenilalanina, o que está de acordo com o resultado obtido por Moraes et al. (2010). De maneira similar ao que se observou com TBA-RS, o tratamento com Sil preveniu o aumento de DCF causado pela fenilalanina e pelo modelo de HPA, e Sil 40 μM , por si só, levou a uma redução significativa

dos níveis de DCF *in vitro* quando comparado aos níveis do grupo controle. Considerando que a Sil apresenta uma alta atividade scavenger de radicais livres (Trouillas et al., 2008), seu efeito em relação a danos protéicos, lipoperoxidação e produção de espécies reativas pode estar ligado à neutralização de compostos reativos.

Sob condições normais, a formação de espécies reativas e sua remoção por antioxidantes estão em equilíbrio, caracterizando a homeostase redox. Nesse estado, o mecanismo de sinalização redox ocorre de maneira eficiente, levando a uma cascata de sinais que modula a expressão de enzimas das defesas antioxidantes e os níveis de glutathione intracelular (Dröge, 2002). O desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e os pró-oxidantes, em favor das espécies reativas, com consequente dano a biomoléculas, gera um quadro definido como estresse oxidativo. Os antioxidantes, como a Sil, podem modular o metabolismo de espécies reativas em diferentes níveis, que vão desde a ação scavenger de ERO até o aumento da expressão de enzimas que atuam como defesas contra o estresse oxidativo (Halliwell, 2006).

A Sil é considerada um antioxidante muito seguro devido à sua baixa toxicidade e adequada tolerância como um agente terapêutico. Sabe-se que a Sil é capaz de aumentar o conteúdo de glutathione nos tecidos (Valenzuela et al., 1989), quelar metais (Borsari et al., 2001), neutralizar radicais livres e inibir lipoperoxidação (De Groot e Rauen, 1998). Somados, todos esses efeitos podem levar à melhoria do estado redox e à maior resistência celular contra o dano oxidativo.

Neste estudo, foi induzido estresse oxidativo no córtex cerebral de ratos tanto *in vitro* quanto pelo modelo de HPA, desencadeando alterações nas defesas antioxidantes enzimáticas e dano a biomoléculas. Isso está de acordo com resultados obtidos em pacientes com PKU (Sirtori et al., 2005; Sanayama et al., 2011). A Sil foi capaz de prevenir os efeitos causados pela fenilalanina e pela condição hiperfenilalaninêmica, por meio do restabelecimento da atividade das enzimas antioxidantes, redução dos danos proteico e lipídico e redução da produção de espécies reativas. Estes resultados indicam que a Sil pode ser útil como uma terapia complementar à dieta restritiva em fenilalanina, proporcionando uma potencial melhoria do estado redox dos pacientes. Mais estudos são necessários para definir claramente os mecanismos pelos quais Sil exerce seus efeitos na HPA e para confirmar seus benefícios clínicos como uma abordagem complementar na PKU.

CONCLUSÃO

Conclusão Geral:

No presente trabalho, verificou-se que a Sil foi capaz de prevenir as alterações dos parâmetros de estresse oxidativo provocadas pela fenilalanina *in vitro* e pelo modelo agudo de HPA em córtex cerebral de ratos.

Conclusões Específicas:

1. Os experimentos *in vitro* demonstraram que a incubação com Sil preveniu as alterações provocadas pela fenilalanina em defesas antioxidantes enzimáticas (CAT, GPx e G6PD), no dano oxidativo a proteínas (carbonilas), na peroxidação lipídica (TBA-RS) e na produção inespecífica de espécies reativas (DCF). Todavia, o modelo experimental *in vitro* não provocou alterações nas atividades enzimáticas da SOD e da GR, tampouco a incubação com Sil alterou esses parâmetros.
2. O tratamento com Sil no modelo agudo de HPA apresentou o mesmo perfil do estudo *in vitro*: houve prevenção das alterações provocadas pelo modelo de HPA em defesas antioxidantes enzimáticas (CAT, GPx e G6PD), no dano oxidativo a proteínas (carbonilas), na peroxidação lipídica (TBA-RS) e na produção inespecífica de espécies reativas

(DCF). De maneira também similar aos resultados *in vitro*, o modelo agudo de PKU não provocou alterações nas atividades enzimáticas da SOD e da GR e o tratamento com Sil não alterou esses parâmetros.

PERSPECTIVAS

- a) Avaliar o efeito da Sil sobre um modelo crônico de HPA.
- b) Analisar a possível prevenção, pela Sil, de alterações nas defesas antioxidantes não-enzimáticas em modelos animais de HPA.
- c) Analisar o efeito da Sil sobre a formação específica de espécies reativas em modelos de HPA.
- d) Analisar a possível prevenção, pela Sil, de danos ao DNA em modelos de HPA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alfadhel M, Al-Thihli K, Moubayed H, Eyaid W, Al-Jeraisy M (2013) Drug treatment of inborn errors of metabolism: a systematic review. *Arch Dis Child* 98:454-461.

Artuch R, Colomé C, Sierra C, Brandi N, Lambruschini N, Campistol J, Ugarte D, Vilaseca MA (2004) A longitudinal study of antioxidant status in phenylketonuric patients. *Clin Biochem* 37:198-203.

Bae YS, Oh H, Rhee SG, Yoo YD (2011) Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Mol Cells* 32:491-509.

Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120:483-495.

Barretto JR, Silva LR, Leite ME, Boa-Sorte N, Pimentel H, Purificação AC, Carvalho G, Fontes MIMM, Amorim T (2008) Poor zinc and selenium status in phenylketonuric children and adolescents in Brazil. *Nutr Res* 28:208-211.

Baud O, Greene AE, Li J, Wang H, Volpe JJ, Rosenberg PA (2004) Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *J Neurosci* 24(7):1531-1540.

Behl C, Moosmann B (2002) Antioxidant neuroprotection in alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radic Biol Med* 33:182-191.

Blau N, Hennermann JB, Langenbeck U, Lichter-Konecki U (2011) Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Mol Genet Metab* 104:S2-S9.

Blau N, van Spronsen F, Levy HL (2010) Phenylketonuria. *Lancet* 376:1417-1427.

Borsari M, Gabbi C, Ghelfi F, Grandi R, Saladini M, Severi S, Borella F (2001) Silybin, a new iron-chelating agent. *J Inorg Biochem* 85:123-129.

Bosisio E, Benelli C, Pirola O (1992) Effect of the flavolignans of *Silybum marianum* L. on lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes. *Pharmacol Res* 25(2):147-154.

Casey L (2013) Caring for children with phenylketonuria. *Can Fam Physician* 59:837-840.

Centerwall SA, Centerwall WR (2000) The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two retarded children, and a scientist. *Pediatrics* 105:89-103.

Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527-605.

Cohen MV (1989) Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this the time for clinical trials? *Ann Inter Med* 111:918-931.

Colomé C, Artuch R, Vilaseca MA, Sierra C, Brandi N, Cambra FJ, Lambruschini N, Campistol J (2002) Ubiquinone-10 content in lymphocytes of phenylketonuric patients. *Clin Biochem* 35:81-84.

Da Cunha AA, Ferreira AGK, Da Cunha MJ, Pederzolli CD, Becker DL, Coelho JG, Dutra-Filho CS, Wyse ATS (2011) Chronic hyperhomocysteinemia induces oxidative damage in the rat lung. *Mol Cell Biochem* 358:153-160.

De Groot H, Rauen U (1998) Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol* 12:249-255.

De Groot MJ, Hoeksma M, Reijngoud DJ, de Valk HW, Paans AMJ, Sauer PJJ, van Spronsen FJ (2013) Phenylketonuria: reduced tyrosine brain influx relates to reduced cerebral protein synthesis. *Orphanet J Rare Dis* doi:10.1186/1750-1172-8-133.

DeRoche K, Welsh M (2008) Twenty-five years of research on neurocognitive outcomes in early-treated phenylketonuria: intelligence and executive function. *Dev Neuropsychol* 33(4):474-504.

Dickson PI, Pariser AR, Groft SC, Ishihara RW, McNeil DE, Tagle D, Griebel DJ, Kaler SG, Mink JW, Shapiro EG, Bjoraker KJ, Krivitzky L, Provenzale JM, Gropman A, Orchard P, Raymond G, Cohen BH, Steiner RD, Goldkind SF, Nelson RM, Kakkis E, Patterson MC (2011) Research challenges in central nervous system manifestations of inborn errors of metabolism. *Mol Genet Metab* 102:326-338

Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.

Duan W, Jin X, Li Q, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T (2010) Silibinin induced autophagic and apoptotic cell death in HT1080 cells through a reactive oxygen species pathway. *J Pharmacol Sci* 113:48-56.

Đuračková Z (2010) Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res* 59:459-469.

Enns GM, Koch R, Brumm V, Blakely E, Suter R, Jurecki E (2010) Suboptimal outcomes in patients with PKU treated early with diet alone: revisiting the evidence. *Mol Genet Metab* 101:99-109.

Ercal N, Aykin-Burns N, Gurer-Orhan H, McDonald JD (2002) Oxidative stress in a phenylketonuria animal model. *Free Radic Biol Med* 32(9):906-911.

Ferreira AL, Matsubara LS (1997) Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil* 43(1):61-68.

Fridovich I (1975) Superoxide dismutases. *Ann Rev Biochem* 44:147-157.

Gassió R, Artuch M, Vilaseca MA, Fusté E, Colome R, Campistol J (2008) Cognitive functions and the antioxidant system in phenylketonuric patients. *Neuropsychology* 22:426-431.

Guthrie R, Susi A (1963) A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 32:338-343.

Gutowski M, Kowalczyk S (2013) A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Acta Biochim Pol* 60(1):1-16.

Hagen MEK, Pederzolli CD, Sgaravatti AM, Bridi R, Wajner M, Wannmacher CM, Wyse AT, Dutra-Filho CS (2002) Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. *Biochim Biophys Acta* 1586:344-352.

Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141:312-322.

Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th edn. Oxford University Press Inc., New York.

Halliwell B, Whiteman M (2004) Measuring reactive species and oxidative damages *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142:231-255.

Hoeksma M, Reijngoud DJ, Pruijm J, de Valk HW, Paans AMJ, van Spronsen FJ (2009) Phenylketonuria: high plasma phenylalanine decreases cerebral protein synthesis. *Mol Genet Metab* 96:177-182.

Hsieh HL, Yang CM (2013) Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *Biomed Res Int* doi:10.1155/2013/484613.

Křen V, Walterová D (2005) Silybin and silymarin – new effects and applications. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 149(1):29-41.

Li J, O W, Li W, Jiang ZG, Ghanbari HA (2013) Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci* 14:24438-24475.

Lidsky AS, Law ML, Morse HG, Kao FT, Rabin M, Ruddle FH, Woo SL (1985) Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the

phenylketonuria locus in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:6221-6225.

Liu J, Litt L, Segal MR, Kelly MJS, Pelton JG, Kim M (2011) Metabolomics of oxidative stress in recent studies of endogenous and exogenous and exogenously administered intermediate metabolites. *Int J Mol Sci* 12:6469-6501.

Loguercio C, Festi D (2011) Silybin and the liver: from basic research to clinical practice. *World J Gastroenterol* 17(18):2288-2301.

Lu P, Mamiya T, Lu LL, Mouri A, Zou LB, Nagai T, Hiramatsu M, Ikejima T, Nabeshima T (2009) Silibinin prevents amyloid β peptide-induced memory impairment and oxidative stress in mice. *Br J Pharmacol* 157:1270-1277.

MacDonald A, van Rijn M, Feillet F, Lund AM, Bernstein L, Bosch AM, Gisewska M, van Spronsen FJ (2012) Adherence issues in inherited metabolic disorders treated by low natural protein diets. *Ann Nutr Metab* 61:289-295.

MacLeod EL, Ney DM (2010) Nutritional management of phenylketonuria. *Ann Nestlé* 68:58-69.

Martinez-Cruz F, Pozo D, Osuna C, Espinar A, Marchante C, Guerrero JM (2002) Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: prevention by melatonin, vitamin E and vitamin C. *J Neurosci Res* 69:550-558.

Martins AM (1999) Inborn errors of metabolism: a clinical overview. *São Paulo Med J* 117(6):251-265.

Marrazzo G, Bosco P, La Delia F, Scapagnini G, Di Giacomo C, Malaguarnera M, Galvano F, Nicolosi A, Li Volti G (2011) Neuroprotective effect of silibinin in diabetic mice. *Neurosci Lett* 504:252-256.

Mateen S, Raina K, Agarwal R (2013) Chemopreventive and anti-cancer efficacy of silibinin against growth and progression of lung cancer. *Nutr Cancer* 65(01):3-11.

Mazzola PN, Terra M, Rosa AP, Mescka CP, Moraes TB, Piccoli B, Jacques CE, Dalazen G, Cortes MX, Coelho J, Dutra-Filho CS (2011) Regular exercise prevents oxidative stress in the brain of hyperphenylalaninemic rats. *Metab Brain Dis* 26(4):291-297.

Mescka C, Moraes T, Rosa A, Mazzola P, Piccoli B, Jacques C, Dalazen G, Coelho J, Cortes M, Terra M, Vargas CR, Dutra-Filho CS (2011) *In vivo* neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis* 26:21-28.

Mescka CP, Wayhs CAY, Vanzin CS, Biancini GB, Guerreiro G, Manfredini V, Souza C, Wajner M, Dutra-Filho CS, Vargas CR (2013) Protein and lipid damage in maple syrup urine disease patients: L-carnitine effect. *Int J Dev Neurosci* 31:21-24.

Michals-Matalon K, Bhatia G, Guttler F, Tying SK, Matalon R (2007) Response of phenylketonuria to tetrahydrobiopterin. *J Nutr* 137:1564S-1567S.

Mira L, Silva M, Manso CF (1994) Scavenging of reactive oxygen species by silibinin dihemisuccinate. *Biochem Pharmacol* 48(4):753-759.

Monteiro LTB, Cândido LMB (2006) Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos. *Rev Nutr* 19:381-387.

Moraes TB, Zanin F, da Rosa A, Oliveira A, Coelho J, Petrillo F, Wajner M, Dutra-Filho CS (2010) Lipoic acid prevents oxidative stress *in vitro* and *in vivo*

by an acute hyperphenylalaninemia chemically-induced in rat brain. J Neurol Sci 292:89-95.

Müzes G, Deák G, Láng I, Nékám K, Gergely P, Fehér J (1991) Effect of the bioflavonoid silymarin on the *in vitro* activity and expression of superoxide dismutase (SOD) enzyme. Acta Physiol Hung 78:3-9.

Nijveldt R, Van Nood E, Van Hoorn DEC, Boelens PG, Van Norren K, Van Leeuwen PAM (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. Am J Clin Nutr 74:418-425.

Nyhan WL (1984) Abnormalities in amino acid metabolism in clinical medicine. Norwalk: Appleton-century Crofts.

Ozalp I, Coskun T, Tokatli A, Kalkanoğlu HS, Dursun A, Tokol S, Köksal G, Özgüc M, Köse R (2001) Newborn PKU screening in Turkey: at present and organization for future. Turk J Pediatr 43(2): 97-101.

Pardridge WM (1998) Blood-brain barrier carrier-mediated transport and brain metabolism of amino acids. Neurochem Res 23(5)635-644.

Pederzolli CD, Rosa AP, de Oliveira AS, Coelho JG, Becker DL, Dalazen GR, Moraes TB, Dutra-Filho CS (2010) Neuroprotective role of lipoic acid against acute toxicity of N-acetylaspartic. *Mol Cell Biochem* 344:231-239.

Ray PD, Huang BW, Tsuji Y (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 24(5):981-990.

Sanayama Y, Nagasaka H, Takayanagi M, Ohura T, Sakamoto O, Ito T, Ishige-Wada M, Usui H, Yoshino M, Ohtake A, Yorifugi T, Tsukahara H, Hirayama S, Miida T, Fukui M, Okano Y (2011) Experimental evidence that phenylalanine is strongly associated to oxidative stress in adolescents and adults with phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 103:220-225.

Saudubray JM & Charpentier C (2001) Clinical phenotypes: diagnosis/algorithms. In *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, eds. CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly & D Valle. New York: MacGraw-Hill.

Scriver CR & Kaufman S (2001) Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. In *The Metabolic & Molecular Inherited Disease*, eds.

CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly & D Walle, 1667-1724. New York: McGraw-Hill.

Sgaravatti A, Magnusson A, Oliveira A, Rosa A, Mescka CP, Zanin FR, Pederzoli CD, Wyse AT, Wannmacher CM, Wajner M, Dutra-Filho CS (2009) Tyrosine administration decreases glutathione and stimulates lipid and protein oxidation in rat cerebral cortex. *Metab Brain Dis* 24:415-425.

Sgaravatti A, Vargas B, Zandoná B, Deckmann K, Rockenback FJ, Moraes TM, Monserrat JM, Sgarbi MB, Pederzoli CD, Wyse AT, Wannmacher CM, Wajner M, Dutra-Filho CS (2008) Tyrosine promotes oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *Int J Devl Neurosci* 26:551-559.

Shefer S, Tint GS, Jean-Guillaume D, Daikhin E, Kendler A, Nguyen LB, Yudkoff M, Dyer CA (2000) Is there a relationship between 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase activity and forebrain pathology in the PKU mouse?. *J Neurosci Res* 61:549-563.

Sierra C, Vilaseca MA, Moyano D, Brandi N, Campistol J, Lambruschini N, Cambra FJ, Deulofeu R, Mira A (1998) Antioxidant status in hyperphenylalaninemia. *Clin Chim Acta* 276:1-9.

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

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

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

Sitta A, Vanzin CS, Biancini GB, Manfredini V, Oliveira AB, Wayhs CAY, Ribas GOS, Giugliani L, Schwartz IVD, Bohrer D, Garcia SC, Wajner M, Vargas CR (2011) Evidence that L-carnitine and selenium supplementation reduces oxidative stress in phenylketonuric patients. *Cell Mol Neurobiol* 31:429-436.

Sonnenbichler J, Scalera F, Sonnenbichler I, Weyhenmeyer R (1999) Stimulatory effects of silibinin and silicristin from the milk thistle *Silybum marianum* on kidney cells. *J Pharmacol Exp Ther* 290(3):1375-1383.

Southorn PA, Powis G (1988) Free radicals in medicine I. Chemical nature and biological reactions. *Mayo Clin Proc.*, 63:381-389.

Surtees R, Blau N (2000) The neurochemistry of phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 159(2):S109-S113.

Trouillas P, Marsal P, Svobodová A, Vostálová J, Gažák R, Hrbáč J, Sedmera P, Křen V, Lazzaroni R, Duroux JL, Walterová D (2008) Mechanism of the antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin flavolignans: a joint experimental and theoretical study. *J Phys Chem A* 112:1054-1063.

Valenzuela A, Aspillaga M, Vial S, Guerra R (1989) Selectivity of silymarin on the increase of the glutathione content in different tissues of the rat. *Planta Med* 55(5):420-422.

Van Backel MME, Printzen G, Wermuth B, Wiesmann UN (2000) Antioxidant and thyroid hormone status in selenium-deficient phenylketonuric and hyperphenylalaninemic patients. *Am J Clin Nutr* 72:976-981.

Van Spronsen FJ, Enns GM (2010) Future treatment strategies in phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 99:S90-S95.

Wajner M, Latini A, Wyse ATS, Dutra-Filho CS (2004) The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J Inherit Metab Dis* 27:427-448.

Wilcken B, Wiley V (2008) Newborn screening. *Pathology* 40:104-115.

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

Zhao J, Agarwal R (1999) Tissue distribution of silibinin, the major active constituent of silymarin, in mice and its association with enhancement of phase II enzymes: implications in cancer chemoprevention. *Carcinogenesis* 20:2101-2108.