

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ROSANE MARIA DOS SANTOS

EFEITO GENOTÓXICO DA FENILALANINA: IMPLICAÇÕES PARA A
FENILCETONÚRIA

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2012

ROSANE MARIA DOS SANTOS

**EFEITO GENOTÓXICO DA FENILALANINA: IMPLICAÇÕES PARA A
FENILCETONÚRIA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de mestrado em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof. Dr^a. Patrícia F. Schuck
Co-Orientador: Prof. Dr. Gustavo da Costa
Ferreira

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2012

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

RESUMO

O acúmulo de fenilalanina (Phe) no cérebro ocorre na fenilcetonúria, doença causada pela deficiente atividade da enzima fenilalanina hidroxilase. Os pacientes fenilcetonúricos apresentam sintomas neurológicos graves. Entretanto os mecanismos fisiopatológicos dos danos cerebrais ainda não são totalmente compreendidos. No entanto, é possível postular que a Phe possa provocar efeitos neurotóxicos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito genotóxico da de altas concentrações fenilalanina em córtex cerebral e sangue periférico de ratos jovens utilizando o Teste Cometa. No experimento em in vivo foi realizada administração aguda de uma única injeção subcutânea de Phe ($5,2 \mu\text{mol/g}$ de peso corporal), p-clorofenilalanina (p-Cl-Phe) ($0,9 \mu\text{mol/g}$ de peso corporal) (um inibidor da enzima PHA) e Phe em associação com p-Cl-Phe; grupo controle recebeu solução salina, e in vitro Phe; utilizando-se um modelo que mimetiza a fenilcetonúria em animais. Os animais foram mortos 1 hora após a administração dos metabólitos. Os danos ao DNA no córtex cerebral foram analisados através do Ensaio Cometa pela medida do índice de dano (ID) e da frequência de dano (FD). Observamos que a Phe e p-Cl-Phe isoladamente induziram dano ao DNA in vivo e da mesma forma a associação de Phe e p-Cl-Phe causou um aumento no ID e FD em comparação ao grupo controle, sugerindo que essa associação induz dano ao DNA. Para os experimentos in vitro, fatias de córtex cerebral e alíquotas de sangue periférico foram incubadas na presença de diferentes concentrações de Phe e na ausência (controle) de durante 30 minutos, a fenilalanina exerceu efeito genotóxico levando a valores de ID e FD significativamente maiores em relação ao grupo controle em córtex cerebral o que não ocorreu em sangue periférico. Nossos resultados fornecem evidências de que danos no DNA podem contribuir para o entendimento dos sintomas neurológicos observados em pacientes afetados por fenilcetonúria.

Palavras-chave: Dano ao DNA; Fenilalanina; Fenilcetonúria.

ABSTRACT

Phenylalanine (Phe) accumulates in the brain of patients affected by phenylketonuria, a disease caused by a deficiency of phenylalanine hydroxylase activity. Phenylketonuric patients present severe neurologic symptoms. However, the pathophysiological mechanisms of the brain damage are not fully understood yet. It may be postulated that Phe may elicit neurotoxicity. This study aimed to evaluate the genotoxic effect of high concentrations of phenylalanine in the cerebral cortex and peripheral blood of young rats using the Comet Test. In experiment was performed in vivo acute administration of a single subcutaneous injection of Phe ((5.2 $\mu\text{mol/g}$ body weight), p-chlorophenylalanine (p-Cl-Phe) (0.9 $\mu\text{mol/g}$ body weight), an enzyme inhibitor PHA and Phe in combination with p-Cl-Phe, at the same dosis control group received saline; In vitro and Phe; using the model mimics the fenicetonúria that in animals. One hour after injection of metabolites, the animals were killed and structures were collected. DNA damage was evaluated using Comet Assay, by calculating index of damage (ID) and frequency of damage (FD). We found that the Phe and p-Cl-Phe alone induced DNA damage in vivo and similarly the association of Phe and p-Cl-Phe caused an increase in ID and FD compared to the control group, suggesting that this association induces damage DNA. For in vitro experiments, slices of cerebral cortex and peripheral blood aliquots were incubated in the presence of different concentrations of Phe and absence (control) for 30 min, phenylalanine genotoxic effect exerted leading to the FD and ID values significantly higher the control group in the cerebral cortex did not occur in peripheral blood. Our data provide evidence that DNA damage may be implicated in the pathophysiology of the brain damage observed in patients affected by phenylketonuria.

Keywords: DNA damage; Phenylalanine; Phenylketonuria.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHRG: Agency for Healthcare Research and Quality

BH4: Tetraidropterina

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EC: Comissão de Enzimas - União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

FD: Frequência de dano

HPA: Hiperfenilalaninemia

ID: Índice de dano

OMIM: Base de Dados Online de Herança Mendeliana em Homem

PAH: Fenilalanina hidroxilase

Phe: Fenilalanina

P-CI-Phe: P-cloro-fenilalanina

PKU: Fenilcetonúria

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classes de Dano obtidas pelo Teste Cometa.	28
Figura 2 - Efeito da administração aguda de fenilalanina (Phe) e p-clorofenilalanina (p-Cl-Phe) sobre o índice de dano ao DNA (ID) em córtex cerebral de ratos jovens. Os dados representam média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em dupla.	29
Figura 3 - Efeito da administração aguda de fenilalanina (Phe) e p-clorofenilalanina (p-Cl-Phe) sobre a frequência de dano ao DNA (FD) em córtex cerebral de ratos jovens. Os dados representam média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em unidades arbitrárias (UA). * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA).	30
Figura 4 - Efeito da administração aguda de fenilalanina (Phe) e p-clorofenilalanina (p-Cl-Phe) sobre o índice de dano ao DNA (ID) em sangue periférico de ratos jovens. Os dados representam média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em unidades arbitrárias (9UA). * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA).	30
Figura 5 - Efeito da administração aguda de fenilalanina (Phe) e p-clorofenilalanina (p-Cl-Phe) sobre a frequência de dano ao DNA (FD) em sangue periférico de ratos jovens. Os dados representam média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em unidades arbitrárias (UA). * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA).	31
Figura 6 - Efeito in vitro da fenilalanina (Phe) sobre o índice de dano ao DNA (ID) em córtex cerebral de ratos jovens. Os dados representam média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em unidades arbitrárias (UA). * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA).	32
Figura 7 - Efeito in vitro da fenilalanina (Phe) sobre a frequência de dano ao DNA (FD) em córtex cerebral de ratos jovens. Os dados representam média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em unidades arbitrária (UA). * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA).	32
Figura 8 - Efeito in vitro da fenilalanina (Phe) sobre o índice de dano ao DNA (ID) em sangue periférico de ratos jovens. Os dados representam média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em unidades arbitrárias (UA). * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA).	33
Figura 9 - Efeito in vitro da fenilalanina (phe) sobre a frequência de dano ao dna (fd) em sangue periférico de ratos jovens. os dados representam média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em unidades arbitrárias (ua). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (anova).	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 FENILCETONÚRIA	8
1.1.1 Prevalência.....	8
1.1.2 Classificação	9
1.1.3 Achados clínicos	13
1.1.4. Achados laboratoriais e diagnóstico.....	14
1.1.5 Tratamento	14
1.1.6 Fisiopatologia	15
1.2 PKU E DNA	18
1.2.1 Reparo do dna.....	18
1.2.2 O Teste do cometa	19
1.2.3 Pku e dano ao dna	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 GERAL	23
2.2 ESPECÍFICOS	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 REAGENTES	24
3.2 ANIMAIS.....	24
3.3 ESTUDOS IN VIVO	24
3.3 1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE	25
3.4 ESTUDOS IN VITRO.....	25
3.5 ENSAIO COMETA	26
3.5.1 Descrição da técnica utilizada	26
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4 RESULTADOS	29
5 DISCUSSÃO	34
REFERÊNCIAS	39
ANEXOS	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 FENILCETONÚRIA

Fenilcetonúria (MIM 261600), também referida por deficiência de fenilalanina hidroxilase (PAH), doença de *Folling*, ou, simplesmente, pelo acrônimo PKU (do inglês *phenylketonuria*), é uma doença metabólica hereditária, de herança mendeliana autossômica recessiva. É causada por uma deficiência na atividade da fenilalanina-4-hidroxilase (PAH; 612349), enzima hepática que catalisa a hidroxilação do aminoácido fenilalanina, resultando em tirosina, em presença de oxigênio molecular, ferro, e do cofator tetraidrobiopterina (BH4) (Blau et al., 2010).

As variantes da fenilcetonúria (PKU) são condições que podem ser resultantes de mais de 500 mutações no gene PAH (MIM 612349), cujo locus compreende a região 23.2 do braço longo do cromossomo 12. Alguns estudos têm sugerido outras causas para a PKU além das mutações no gene PAH per se. De fato, a doença pode ser resultante da falta do fator de transcrição nuclear hepático HNF1, o qual ativa genes de várias enzimas hepáticas, e cuja ausência tornaria o gene PAH silencioso (Pontoglio et al., 1996).

1.1.1 Prevalência

A prevalência da PKU varia amplamente no mundo. Para ilustrar, na Europa a prevalência é de aproximadamente um caso a cada 10.000 nascidos vivos, embora em algumas áreas a prevalência seja muito mais alta (Loeber, 2004; Blau et al., 2010). Nos Estados Unidos, essa taxa é de cerca de um caso por 15.000 nascimentos (*National Institutes of Health Consensus Development Panel*) (NIHCDP, 2001; Blau et al., 2010).

Na América Latina, a prevalência varia de um caso para cada 25.000 a um por 50.000 nascimentos, sendo que a prevalência da porção mais meridional é mais alta que a das demais regiões (Borrajo, 2007; Blau et al., 2010). Estima-se que as taxas de prevalência na Ásia variem de aproximadamente um para 15.000 a um para 100.500 nascimentos em regiões chinesas (Jiang et al., 2003; Zhan et al., 2009; Blau et al., 2010); menos de um para 200.000 na Tailândia (Pangkanon et al., 2009; Blau et al., 2010); e aproximadamente um para 70.000 no Japão (Aoki et al., 2007; Blau et al., 2010). Em geral, a PKU é muito pouco prevalente na África (Blau et al., 2010).

Segundo levantamento da Sociedade Brasileira de Triagem Neonatal (SBTN), em pesquisa efetuada em dez estados brasileiros (São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, Bahia, Santa Catarina, Maranhão), com 95% de resposta, até o ano de 2000 haviam sido triadas 13,32 milhões de crianças para investigação de fenilcetonúria, sendo detectados 861 casos positivos e prevalência de 1:15.500. (Monteiro et al. 2006, apud Carvalho, 2003)

1.1.2 Classificação

Como anteriormente sugerido, a PKU apresenta variantes fenotípicas. Os tipos I e III correspondem clinicamente à PKU clássica e hiperfenilalaninemia (HPA) suave, respectivamente; o tipo intermediário (II) corresponde clinicamente à PKU suave (Langenbeck et al., 2009). Essas três formas de apresentação metabólicas podem ser caracterizadas de acordo com o percentual de atividade enzimática encontrado. Assim, a PKU clássica (I) ocorre quando a atividade da PAH é

praticamente ausente (atividade inferior a 1%) e, conseqüentemente, os níveis plasmáticos encontrados para fenilalanina são superiores a 20 mg/dl; a PKU leve (II), por sua vez, ocorre quando a atividade da PAH é de 1-3% e os níveis plasmáticos de fenilalanina encontram-se entre 10 mg/dl e 20 mg/dl; e, finalmente, a HPA transitória ou permanente (III) resulta de uma atividade enzimática superior a 3% e os níveis de fenilalanina encontram-se entre 4 mg/dl e 10 mg/dl (Treffz et al., 1984). Considerada benigna, esta última situação geralmente não acarreta qualquer sintomatologia clínica (Scriver e Kaufman, 2001).

As HPAs são causadas ora por déficit da atividade da PAH, ora por deficiência de seu cofator tetraidropterina (BH4). A HPA dita maligna inclui defeitos em três enzimas relacionadas à síntese de BH4 - ou seja, diidropteridina redutase (DHPR), 6-piruvil tetraidropterina sintase (PTPS) e guanosina trifosfato cicloidrolase (GTP-CH). É importante esclarecer que a deficiência de BH4 pode comprometer, além da PAH, duas outras enzimas hidroxilases (tirosina/triptofano hidroxilase), e distúrbios neurológicos podem se estabelecer em virtude da falta de neurotransmissores (Shintaku, 1992).

Segundo Martins (2003) o diagnóstico é realizado, primeiramente pelo teste de triagem neonatal, Teste do Pézinho, obrigatório a partir do Estatuto da Criança e do Adolescente, inciso III do Artigo 10 da Lei nº de 13/07/1090); cujos valores normais para PHe devem ser entre 2-4mg/dl (120 – 240 µmol/L) , e hiperfenilalaninemia acima de 4mg/dl, em cuja presença o exame deve ser repetido se o resultado for acima de 10mg/dl, fazer o teste de tolerância à Phe, para determinação do tipo de fenilcetonúria e iniciar o tratamento.

A Portaria SAS/MS nº 712 de 17 de dezembro de 2010, estabelece o Protocolo Clínico e diretrizes terapêuticas para fenilcetonúricos, considerando como

critério de inclusão de tratamento pacientes com níveis de PHe igual ou maior do que 10 mg/dl (600 μ mol/L) e todos que apresentarem níveis entre 8 a 10 mg/dl persistentes em três dosagens consecutivas semanais em dieta normal, e que o controle metabólico em mulheres dever ser atingido com níveis de Phe abaixo de 6 mg/dl antes da concepção e durante toda a gestação, afirma ainda que autores britânicos e alemães recomendam manter níveis entre 1 a 4 mg/dl (60 – 240 μ mol /L) antes e durante a gestação e o estudo Colaborativo materno de FNC, recomenda 2 a 6 mg/dl (120 a 360 μ mol /L), sendo que o tratamento para FNC deve ser iniciado precocemente e de preferência continuar por toda a vida. (Ministério da Saúde, 2010)

Apresenta - se a seguir rota metabólica da Fenilalanina e Tirosina:

1.1.3 Achados clínicos

A PKU possui uma semiologia caracterizada por sintomas que variam de suaves a severos. Bebês nascidos com PKU clássica parecem saudáveis nos primeiros meses após o nascimento. Contudo, sem tratamento apropriado (que compreende, sobretudo, uma dieta com restrição de fenilalanina) tem retardo mental grave, peso cerebral abaixo do normal, defeito na mielinização dos nervos, reflexos hiperativos, expectativa de vida encurtada, metade podendo morrer por volta de 20 anos e e três quartos em torno de trinta anos (Berg et al., 2004), irritabilidade expressa pela dificuldade de dormir, alimentar-se e choro freqüente (Amorim, Gatto, et al., 2005). Podendo na PKU clássica ainda apresentarem deficiência na pigmentação (pele e cabelos), eczemas, complicações neurológicas, atitudes autistas, transtornos de conduta, falhas no andar ou falar, hiperatividade, tremores, falhas no crescimento e retardo mental (Scriver, 2001 Mira e Marquez, 2000).

Odor de mofo e microcefalia também são manifestações clínicas relacionadas a esta doença. Estudos têm demonstrado que adolescentes e adultos fenilcetonúricos tratados continuamente diferem significativamente de controles saudáveis, em relação aos seguintes parâmetros: QI em escala completa, velocidade de processamento, atenção, inibição, e controle motor (Moyle et al., 2007).

Levy et al. (2001) demonstraram que gestantes fenilcetonúricas (PKU materna), com níveis séricos de fenilalanina iguais ou superiores a 900 μmol (15 mg/dL), têm risco elevado para gerar descendentes com cardiopatias congênitas (por exemplo, coarctação da aorta e síndrome hipoplásica do coração esquerdo).

Isso poderia ser evitado caso essas mulheres iniciassem uma dieta restrita em fenilalanina antes ou até a oitava semana da gestação.

1.1.4. Achados laboratoriais e diagnóstico

O principal método para o diagnóstico de PKU é por espectrofotometria, método utilizado no teste triagem neonatal conhecido no Brasil como “Teste do Pezinho”. O método baseia-se na detecção quantitativa fidedigna de fenilalanina e tirosina, bem como da razão tirosina/fenilalanina, em um pequeno volume de sangue em papel filtro. Fornece uma taxa relativamente baixa de falso-positivos, e pode ser útil na detecção simultânea de metabólito(s) envolvidos em outras doenças hereditárias (Chace et al., 1998; Blau et al., 2010).

Os metabólitos excretados na urina por pacientes fenilcetonúricos incluem fenilpiruvato, fenil-lactato, orto-hidroxifenilacetato. Esses compostos são obtidos a partir da degradação da fenilalanina por vias metabólicas acessórias, visto que há deficiência de PAH (Williams et al, 2008). E porquanto sua produção depende de reações catalisadas por descarboxilases/transaminases, não são marcadores fidedignos para o diagnóstico diferencial da PKU clássica (Brenneman & Kaufman, 1964; Scriver et al, 2008).

1.1.5 Tratamento

O tratamento da PKU é ainda essencialmente paliativo, podendo perdurar por toda a vida do paciente (AHRQ, 2012). A principal estratégia terapêutica da PKU clássica é a restrição dietética de fenilalanina, a fim de controlar os níveis do

aminoácido no plasma. Como regra geral, o objetivo do tratamento é manter esses níveis entre 120 e 360 $\mu\text{mol/L}$. Uma das maiores desvantagens dessa dieta rígida é seu baixo valor nutritivo, motivo pelo qual muitos pacientes devem realizar suplementação diária com vitaminas e minerais (NIH Consensus, 2001; Giovannini et al., 2007; AHRQ, 2012).

Outra estratégia disponível é a suplementação com os chamados grandes aminoácidos neutros (metionina, tirosina e triptofano). Postula-se que esses aminoácidos promovam a diminuição dos níveis de fenilalanina no cérebro por competir por um transportador situado na barreira hematoencefálica (Matalon et al., 2006; Sarkissian et al., 2009; AHRQ, 2012).

1.1.6 Fisiopatologia

Não obstante a deficiência de PAH seja um fenótipo essencialmente hepático, o maior impacto do excesso de fenilalanina é sobre a função e o desenvolvimento cerebral. Desse modo, a fisiopatologia da PKU pode ser compreendida a partir de três pontos de vista: (1) uma suposta deficiência de tirosina no cérebro; (2) o efeito do excesso de fenilalanina sobre o transporte e a distribuição de metabólitos no cérebro; (3) e efeitos sobre processos neuroquímicos (Scriver et al., 2008).

Os níveis de fenilalanina são elevados no cérebro de indivíduos fenilcetonúricos com deficiência intelectual (McKean e Peterson, 1970; Scriver et al., 2008). Os metabólitos da fenilalanina não estão presentes em concentrações suficientes para serem mais tóxicos que esse aminoácido (Kaufman, 1989; Scriver et al., 2008). Além disso, estudos de imagem de ressonância magnética funcional

sugerem que certas regiões interconectadas do cérebro são funcionalmente menos conectadas em pacientes com PKU, quando comparados a controles saudáveis (Christ et al., 2010 e 2012).

A concentração plasmática limite de fenilalanina para seu efeito neurotóxico agudo (1300 $\mu\text{mol/L}$) não corresponde necessariamente ao valor relacionado com a neurotoxicidade crônica na PKU (Krause et al., 1986; Scriver et al., 2008). Teores menores de fenilalanina, da ordem de 600 $\mu\text{mol/L}$, estão associados a alterações na substância branca cerebral em pacientes com HPA crônica (Bick et al., 1991; Scriver et al., 2008).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que a fenilalanina e certos aminoácidos de cadeia ramificada (grandes aminoácidos neutros) competem por transportadores situados na barreira hematoencefálica (Momma et al., 1987; Scriver et al., 2008). Como a fenilalanina é o aminoácido com maior afinidade por essas proteínas, seus níveis elevados podem comprometer o influxo cerebral dos outros grandes aminoácidos neutros (Scriver et al., 2008).

A fenilalanina também inibe o transporte de tirosina (Aragon et al., 1982; Scriver et al., 2008) e de triptofano (Herrero et al., 1983; Scriver et al., 2008) ao longo da membrana plasmática de vesículas sinaptossomais. Sendo a tirosina sequestrada por células somáticas e tendo seu influxo cerebral inibido, há disponibilidade reduzida desse precursor para a biossíntese de catecolaminas no SNC. Analogamente, a síntese de serotonina a partir de triptofano também é prejudicada (McKean, 1972; Scriver et al., 2008).

Bodner et al. (2012), descobriram que indivíduos fenilcetonúricos tratados precocemente tinham o volume do putâmen maior (estrutura que desempenha um importante papel na cognição) do que o de controles saudáveis. Esse e outros

achados são consistentes com a hipótese de que o excesso de fenilalanina leva a níveis centrais de dopamina diminuídos, impactando assim sobre regiões cerebrais dependentes de dopamina.

A hipótese do comprometimento direto da mielinização por elevadas concentrações de fenilalanina ou seus metabólitos (fenilpiruvato, fenilacetato, entre outros) ainda é controversa. Schoemans et al. (2010) não detectaram nenhum efeito citotóxico desses compostos em oligodendrócitos cultivados. Ademais, descobriram que o processo de mielinização não é afetado em células mielinizantes cultivadas em um meio enriquecido com fenilalanina ou seus metabólitos. Esses dados demonstram que a hipomielinização por esses compostos pode ser desencadeada por mecanismos alternativos.

A taxa de síntese de proteínas cerebrais pode ser diminuída em condições hiperfenilalaninêmicas. Estudos cerebrais de tomografia de emissão de pósitrons sugeriram uma correlação negativa entre a concentração de fenilalanina plasmática e a taxa de síntese de proteínas cerebral. Ademais, concentrações plasmáticas elevadas de fenilalanina (600-800 $\mu\text{M/L}$) diminuíram essa taxa, comparadas a concentrações séricas mais baixas do aminoácido (Hoeksma et al., 2009).

Outro mecanismo supostamente envolvido na fisiopatologia da PKU é a inibição da enzima creatina cinase. Descobriu-se que a fenilalanina inibe a atividade dessa enzima *in vitro* e reduz sua atividade *in vivo*. Essa inibição, que também é observada em fenilcetonúricos, poderia acarretar comprometimento da homeostase cerebral nesses pacientes (Costabeber et al., 2003).

Zhang e colegas demonstraram que neurônios corticais cerebrais cultivados sofreram morte celular por apoptose quando expostos à fenilalanina. Além

disso, demonstraram que esse aminoácido induziu a ativação de gen homólogo da família Ras (RhoA). Esse hormônio é conhecido por regular a morfogênese em células neuronais. Contudo, é também capaz de ativar o sistema mitocondrial RhoA/ROCK, reação em cadeia que termina com a ativação da caspase 3 e consequente início da apoptose (Zhang et al., 2007).

Em última análise, a HPA crônica prejudica o desenvolvimento da arquitetura cerebral em pacientes fenilcetonúricos não tratados. Isso ocorre, por exemplo, sob a forma de alterações na mielinização, na largura da placa cortical, na densidade e organização celular, na arborização dendrítica e no número de espinhas sinápticas (Bauman e Kemper, 1982; Scriver et al., 2008).

1.2 PKU e DNA

1.2.1 Reparo do dna

As células possuem diversos sistemas para o reparo de alterações no DNA. Os sistemas de reparo por excisão de bases detectam e reparam a lesão causada por agentes ambientais (tais como a radiação e os agentes alquilantes) e reações espontâneas de nucleotídeos. Identificado o segmento contendo bases lesadas/incorrectas, este é excisado do DNA e substituído (Lehninger et al., 2006).

Os sistemas de reparo por excisão de nucleotídeos detectam e removem uma gama de lesões salientes e dímeros de pirimidina. Eles excisam um segmento da fita de DNA, incluindo a lesão, deixando uma lacuna que é preenchida pelas atividades das enzimas DNA polimerase e DNA ligase (Lehninger et al., 2006).

Finalmente, algumas lesões do DNA são reparadas pela reversão direta da reação que causou a lesão. Por exemplo, dímeros de pirimidina são convertidos diretamente às pirimidinas originais por uma fotoliase. Nos eucariotos, as lesões por mutação são minimizadas a partir da ação de polimerases (Lehninger et al., 2006).

1.2.2 O Teste do cometa

O teste do cometa tem adquirido importância em estudos de toxicogenética, devido a suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. Esse ensaio identifica lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Ao contrário das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção (Ribeiro et al., 2003).

Em síntese, o teste se fundamenta em uma série de tratamentos químicos que objetivam precipitar o DNA dos outros componentes celulares, sob a forma de nucleoide. Esta última estrutura consiste de uma série de alças superenoveladas de DNA desprovido de histonas, aderidas à matriz nuclear residual, do tamanho do núcleo da célula (Ribeiro et al., 2003). Se houver quebras na molécula de DNA, a estrutura do nucleoide sofre mudanças, visto que as alças do DNA se desnovelam formando um halo (Cook e Brazell, 1976, 1978; Vogelstein et al., 1980; Ribeiro et al, 2003).

O ensaio cometa emprega tensoativos, a fim de lisar as células e precipitar seu material genético. É também feita uma digestão dos nucleoides obtidos, com enzimas de reparo (endonuclease III, formamidopirimidina DNA-glicosilase, endonuclease V, entre outras), para detecção de lesões específicas.

Posteriormente, a etapa do relaxamento das moléculas de DNA consiste de uma exposição de suas fitas a uma solução altamente alcalina; seu objetivo é favorecer a expressão de sítios álcali-lábeis na molécula. Por fim, é executada uma eletroforese e subsequente coloração dos cometas obtidos (geralmente empregando-se corantes fluorescentes) (Ribeiro et al., 2003).

O teste é útil na detecção de agentes genotóxicos (por ser simples e de baixo custo, sendo promissor para a avaliação de produtos químicos em larga escala), no estudo do reparo do DNA (o teste do cometa é rápido e eficaz na determinação da cinética de reparo do DNA) e para fins de biomonitoramento (Ribeiro et al., 2003).

1.2.3 Pku e dano ao dna

Há diversas evidências de que níveis elevados de fenilalanina e/ou seus metabólitos induzem reações de estresse oxidativo; ou, pelo menos, comprometam os sistemas enzimáticos/não-enzimáticos de defesas antioxidantes em humanos (Sirtori et al., 2005; Sitta, 2007; Sitta et al., 2009; Sanayama et al., 2011; Vargas et al., 2011).

Todavia, a maioria dessas pesquisas tem enfatizado o papel do estresse oxidativo sobre proteínas e lipídeos de membrana, a partir da medida de marcadores séricos de lipoperoxidação (por exemplo, níveis de malondialdeído e espécies reativas do ácido tiobarbitúrico) e oxidação de proteínas (teores de carbonilas e de sulfidrilas). Um contingente limitado de estudos tem investigado a suposta correlação entre os níveis de fenilalanina e o dano ao DNA.

Utilizando uma lâmpada de bronzamento artificial emissora de raios UVA, Hargreaves et al. (2007) demonstraram que a fotólise do ácido β -fenilpirúvico (metabólito da fenilalanina) gera radicais carboxil. Além disso, esse processo também era capaz de iniciar reações de transferência de elétrons. A fim de determinar os efeitos biológicos desse processo, fagócitos T7 foram expostos aos agentes reativos produzidos pela fotólise e eram inativados. Dano ao DNA e/ou a seus componentes pode estar envolvido com a inativação das células T7.

Um estudo realizado recentemente evidenciou um efeito dose-dependente da fenilalanina sobre o dano ao DNA. Esse efeito foi observado em leucócitos normais incubados com diversas concentrações do aminoácido. Ademais, através da análise de leucócitos sanguíneos, verificou-se que o índice de dano ao DNA foi significativamente mais alto em pacientes fenilcetonúricos comparado a fenilcetonúricos tratados adequadamente e a voluntários sadios (Sitta et al., 2009a).

Existem outras evidências que mostram que níveis séricos elevados de fenilalanina podem induzir dano ao DNA. Constatou-se que pacientes fenilcetonúricos em tratamento apresentaram maior dano ao DNA, medido através de ensaio do cometa, em relação aos controles. E que esse dano era associado a elevadas concentrações plasmáticas de fenilalanina (Sitta et al, 2009a).

Schulpis et al. (2005) demonstraram que pacientes fenilcetonúricos sem controle rigoroso da dieta apresentavam um estado antioxidante total (TAS) menor que o de fenilcetonúricos com dieta apropriada e crianças saudáveis. Somado a esse achado, esses pesquisadores descobriram também que os níveis de fenilalanina e de um marcador de dano ao DNA (8-hidroxi-2-desoxiguanosina – 8-OHdG) eram maiores no grupo de fenilcetonúricos sem controle da dieta. Níveis

elevados de 8-OHdG coexistem com doenças neurodegenerativas, e podem constituir um bom marcador da oxidação do DNA induzida pela fenilalanina.

Em virtude das evidências apresentadas, é possível que a fenilalanina seja um agente genotóxico. Entretanto, mais pesquisas devem ser levadas a cabo, com a finalidade de se elucidar os possíveis mecanismos pelos quais o aminoácido em questão gera dano ao DNA.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar os efeitos genotóxicos *in vivo* e *in vitro* da fenilalanina em córtex cerebral e sangue periférico de ratos jovens.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito genotóxico *in vitro* de várias concentrações de fenilalanina através do ensaio cometa em córtex cerebral e sangue periférico de ratos;
- Reproduzir um modelo animal experimental de PKU através da administração aguda subcutânea de fenilalanina e de p-cloro-fenilalanina em ratos de 30 dias de vida;
- Avaliar o efeito genotóxico da administração aguda subcutânea de fenilalanina e de p-cloro-fenilalanina através do ensaio cometa em córtex cerebral e sangue periférico de ratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Todos os reagentes foram obtidos da empresa Sigma (St. Louis, MO, USA). A fenilalanina e p-cloro fenilalanina foram dissolvidas em tampão específico para a técnica por aquecimento no dia dos experimentos e o pH das soluções foi ajustado para 7,4.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 36 ratos Wistar machos de 30 dias de vida fornecidos pelo Biotério da Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense. A utilização dos animais seguiu os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (Principles of Laboratory Animal Care, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 85-23, revisada em 1996). Este estudo teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense sob protocolo **67/2010**.

3.3 ESTUDOS IN VIVO

Os animais foram divididos em quatro grupos, constituídos de 6 animais por grupo. No grupo 1 (controle), os animais receberam uma injeção subcutânea de NaCl 0,9 %; no grupo 2, os animais receberam uma injeção subcutânea de

fenilalanina na dose de 5,2 $\mu\text{M/g}$ de peso corporal; no grupo 3, os animais receberam uma injeção subcutânea de p-cloro fenilalanina na dose de 0,9 $\mu\text{M/g}$ de peso corporal; no grupo 4, os animais receberam uma única injeção subcutânea de uma solução contendo fenilalanina na dose de 5,2 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal associada a uma solução de p-cloro fenilalanina na dose de 0,9 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal.

3.3 1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE

Os animais sofreram eutanásia 1 hora após a injeção, por decapitação com guilhotina e sem anestesia, o sangue foi armazenado em tubos descartáveis previamente heparinizados e mantidos no gelo. A caixa craniana foi aberta e o seu conteúdo retirado e, a partir de então, mantido sobre uma placa de vidro a aproximadamente 8°C. O córtex cerebral foi dissecado e retirado o excesso de sangue dos vasos externos.

3.4 ESTUDOS IN VITRO

Para os experimentos in vitro, foram utilizados 12 animais sem prévio tratamento. Os animais sofreram eutanásia por decapitação com guilhotina e sem anestesia, o sangue foi retirado e armazenado até o momento da incubação em tubos descartáveis previamente heparinizados. A caixa craniana foi aberta e o seu conteúdo retirado. O córtex cerebral foi limpo e dividido, sendo retirado o excesso de sangue dos vasos externos. Fatias de córtex cerebral e amostras de sangue periférico foram incubadas na ausência (grupo controle) ou presença de diferentes

concentrações de fenilalanina (0,5; 1,0 ou 2,5 mM) durante 30 minutos a 37 °C. Após este período, as amostras foram colocadas em gelo e mantidas ao abrigo da luz até o momento da realização da análise.

3.5 ENSAIO COMETA

3.5.1 Descrição da técnica utilizada

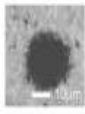
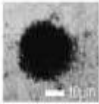
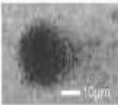
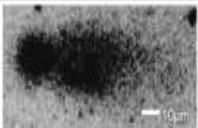
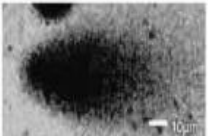
O Ensaio Cometa seguiu os protocolos internacionais já estabelecidos para a sua realização (Silva et al., 2000; Tice et al., 2000). As lâminas foram preparadas através da mistura de 5 µL de sangue ou córtex cerebral com 95 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,75%), onde essa mistura (células e agarose) foi depositada sobre uma lâmina de microscopia previamente coberta por uma película de 500 µL de agarose de ponto de fusão normal (1,5%) e adicionada uma lamínula sobre a mistura. As amostras foram colocadas na geladeira por 5 a 10 minutos para solidificação da amostra. Após a solidificação, as lamínulas foram suavemente removidas e as lâminas submersas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM e Tris 10 mM, pH 10,0-10,5), para exposição do núcleo celular, por tempo mínimo de 1 hora e máximo de 1 semana. Sequencialmente, as lâminas foram incubadas no tampão alcalino (pH > 13) por 20 minutos, com temperatura aproximada de 4°C. Após isso, as lâminas passaram por uma eletroforese durante 15 minutos a 25 volts (0,90 V/cm) e 300 mA, e então neutralizadas com Tris 0,4M (pH 7,5). Após a neutralização, as lâminas foram colocadas na estufa a 37°C para posterior secagem durante 1 hora e 30 minutos para iniciar-se a coloração com nitrato de prata. Após a secagem, as lâminas foram distribuídas em lâminas com solução fixadora (ácido

tricloroacético 15% p/v, sulfato de zinco 5% p/v, glicerol 5% v/v) por 10 minutos e então, colocadas novamente na estufa a 37°C por 1 hora e 30 minutos. As lâminas foram hidratadas durante 5 minutos com água destilada e em seguida coradas com a solução de coloração (carbonato de sódio 5% p/v, nitrato de amônio 0,1% p/v, nitrato de prata 0,1% p/v, ácido tungstosílico 0,25% p/v, formaldeído 0,15% v/v, preparada no escuro), onde as cubetas foram mantidas em banho-maria a 37°C por 15 minutos. As lâminas foram lavadas 3 vezes com água destilada e depois submersas em solução stop (ácido acético 1% v/v) durante 5 minutos, e então lavadas novamente por 3 vezes com água destilada e colocadas novamente na estufa a 37°C por 1 hora e 30 minutos para posterior análise.

Imagens de 100 células selecionadas de cada amostra ao acaso foram analisadas utilizando-se microscópio óptico em aumento de 100x ou 400x. O dano apresentado foi avaliado classificando-se cada célula de acordo com as cinco classes de dano existentes, que se inicia em dano 0 (= ausência de dano) e vai até o dano 4 (= máximo de dano) identificados através do tamanho e forma. Então, os valores obtidos para cada amostra foram agrupados em escala de 0 (0x100) a 400 (4x100). Foram utilizados dois parâmetros para avaliação: o índice de dano (ID) que é baseado na distância da migração e na quantidade de DNA na cauda, e é considerado uma medida sensível de dano ao DNA calculado segundo a fórmula $ID_{total} = 0 \cdot (n \cdot \text{classe } 0) + 1 \cdot (n \cdot \text{classe } 1) + 2 \cdot (n \cdot \text{classe } 2) + 3 \cdot (n \cdot \text{classe } 3) + 4 \cdot (n \cdot \text{classe } 4)$; e a frequência de dano (FD) foi calculada como a percentagem de células com cauda (classe 1 a 4) utilizando-se a fórmula $FD = [(n \cdot \text{total} - n \cdot \text{classe } 0) \cdot 100] / n \cdot \text{total}$. (Di Paolo, 2006 apud Andrade e Colaboradores, 2004)

A Classificação foi visual baseada em tabela que relaciona cabeça e cauda e classifica em uma das classe de danos:

Figura 1 - Classes de Dano obtidas pelo Teste Cometa.

<i>ObservedDNA damage</i>	<i>Head/ Tail</i>	<i>Damage classes</i>
	No tail	0
	≤ 1	1
	1 - 2	2
	≥ 2	3
	No head	4

Fonte: Villela et al., 2006.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística utilizada foi selecionada de acordo com o desenho experimental utilizado e com o tipo de distribuição apresentado pelo conjunto dos dados. Assumindo que os dados tenham uma distribuição normal, para comparação de três ou mais médias, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via para análise dos dados obtidos seguida pelo teste “*post hoc*” dos raios múltiplos de Duncan. As análises estatísticas foram feitas pelo programa SPSS versão 16.0. Foi considerada diferença significativa quando o valor de $P \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

Primeiramente, avaliamos os efeitos de altas concentrações de fenilalanina obtidas através da administração deste aminoácido e/ou da p-cloro fenilalanina. Os dados estão apresentados na forma dos dois parâmetros do ensaio cometa, índice de dano (ID) e frequência de dano (FD). A Figura 2 apresenta os resultados de ID em córtex cerebral de ratos submetidos à administração de NaCl 0,9 % (controle), fenilalanina 5,2 $\mu\text{mol/g}$, p-clorofenilalanina 0,9 $\mu\text{mol/g}$ ou da associação de fenilalanina 5,2 $\mu\text{mol/g}$ e p-clorofenilalanina 0,9 $\mu\text{mol/g}$. Podemos observar que os grupos que receberam fenilalanina e p-clorofenilalanina isolados ou em associação obtiveram valores de ID significativamente maior quando comparado ao grupo controle. A Figura 2 mostra a FD resultante do ensaio cometa, em que observamos resultados similares ao ID, confirmando, assim, os efeitos genotóxicos causados em córtex pelo aumento das concentrações de fenilalanina nos tecidos.

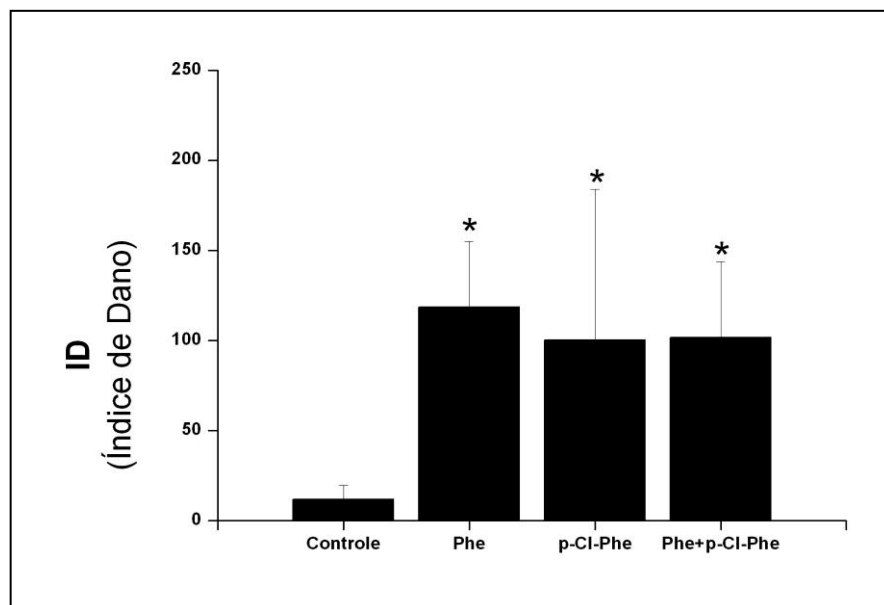


Figura 2 - Efeito da administração aguda de fenilalanina (Phe) e p-clorofenilalanina (p-Cl-Phe) sobre o índice de dano ao DNA (ID) em córtex cerebral de ratos jovens. Os dados representam média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em dupla.

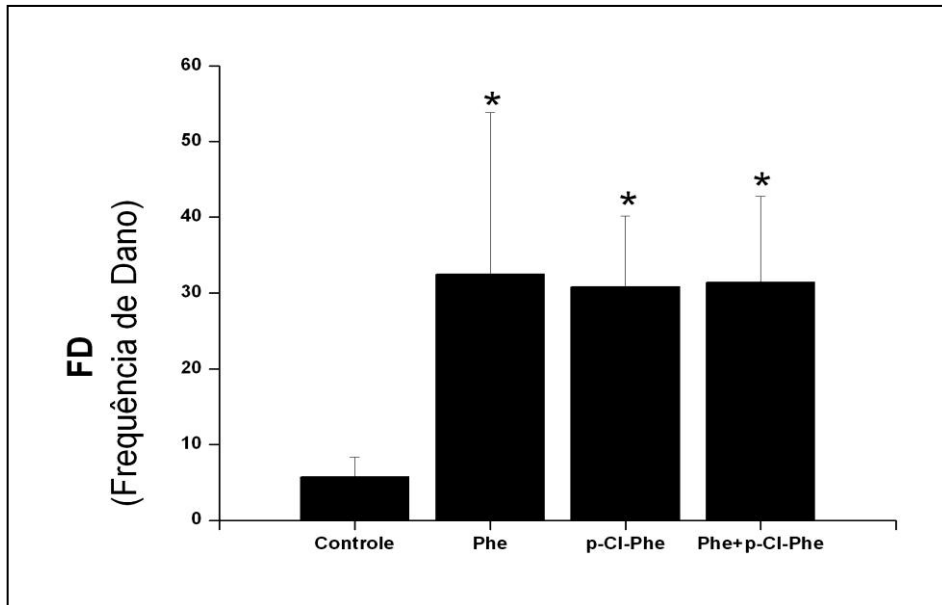


Figura 3 - Efeito da administração aguda de fenilalanina (Phe) e p-clorofenilalanina (p-Cl-Phe) sobre a frequência de dano ao DNA (FD) em córtex cerebral de ratos jovens. Os dados representam média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em unidades arbitrárias (UA). * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA)

Os efeitos de altas concentrações de fenilalanina em sangue foram semelhantes aos apresentados em córtex. As Figuras 3 e 4 demonstram o aumento dos valores de ID e FD, respectivamente, ocasionados pela hiperfenilalaninemia obtida através da administração de fenilalanina e/ou da p-clorofenilalanina.

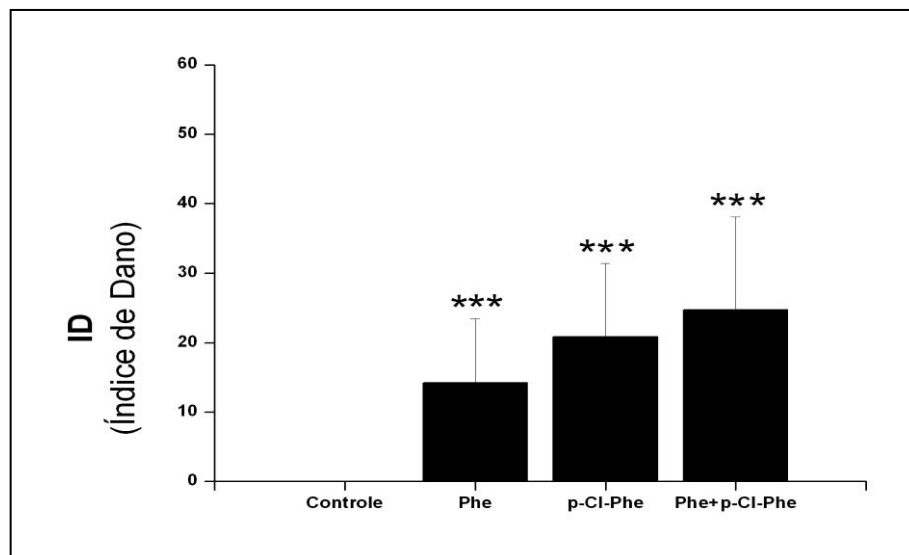


Figura 4 - Efeito da administração aguda de fenilalanina (Phe) e p-clorofenilalanina (p-Cl-Phe) sobre o índice de dano ao DNA (ID) em sangue periférico de ratos jovens. Os dados representam média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em unidades arbitrárias (9UA). * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA)

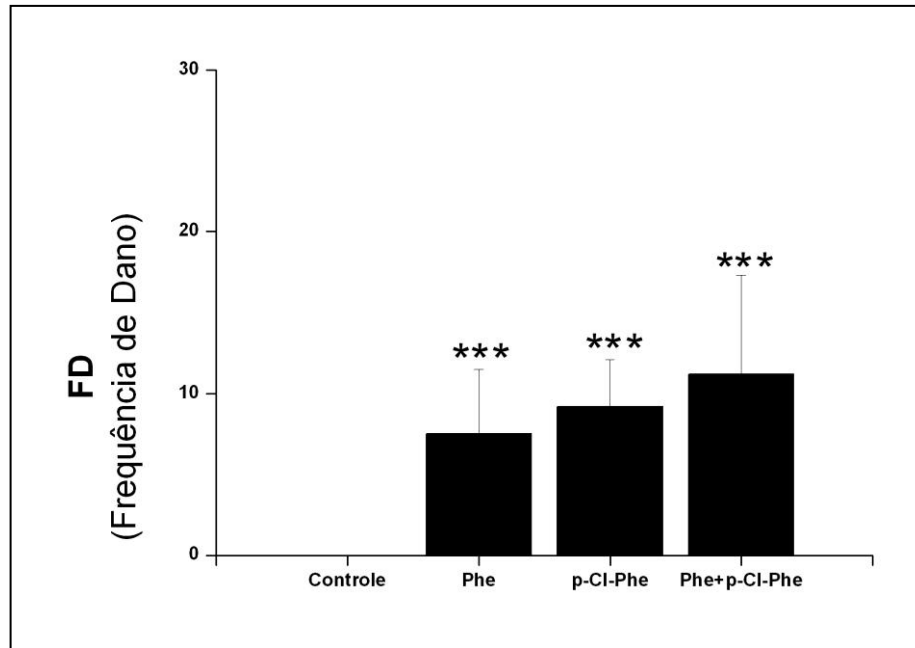


Figura 5 - Efeito da administração aguda de fenilalanina (Phe) e p-clorofenilalanina (p-Cl-Phe) sobre a frequência de dano ao DNA (FD) em sangue periférico de ratos jovens. Os dados representam média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em unidades arbitrárias (UA). * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA).

Nos experimentos *in vitro*, amostras de córtex de ratos sem prévia manipulação foram incubadas por 30 minutos na ausência (controle) ou presença de diferentes concentrações de fenilalanina (0,5; 1,0; 2,5 mM). As Figuras 5 e 6 demonstram os efeitos das diferentes concentrações de fenilalanina sobre o DNA em córtex cerebral. Podemos observar que as concentrações de 1 e 2,5 mM de fenilalanina levaram ao aumento dos valores de ID e FD.

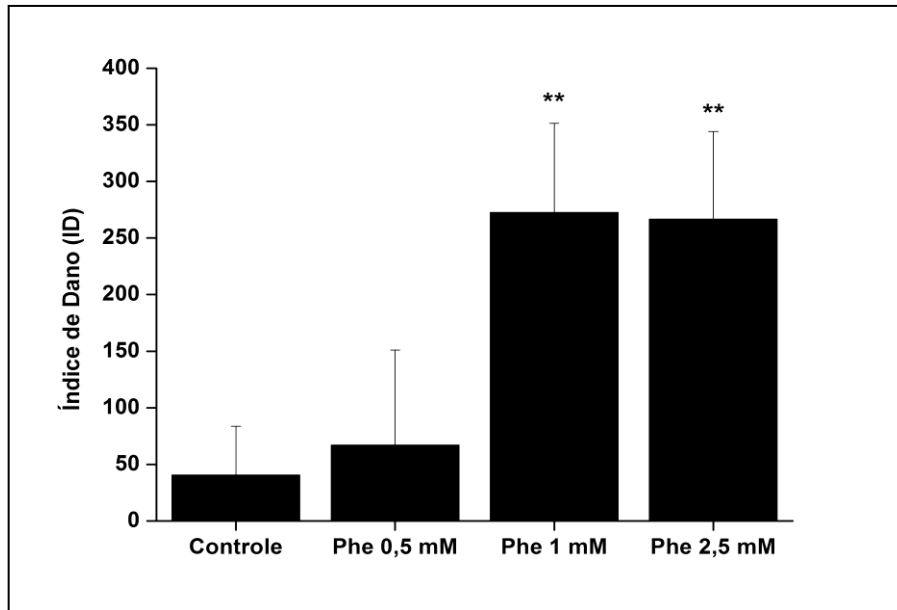


Figura 6 - Efeito in vitro da fenilalanina (Phe) sobre o índice de dano ao DNA (ID) em córtex cerebral de ratos jovens. Os dados representam média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em unidades arbitrárias (UA). * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA).

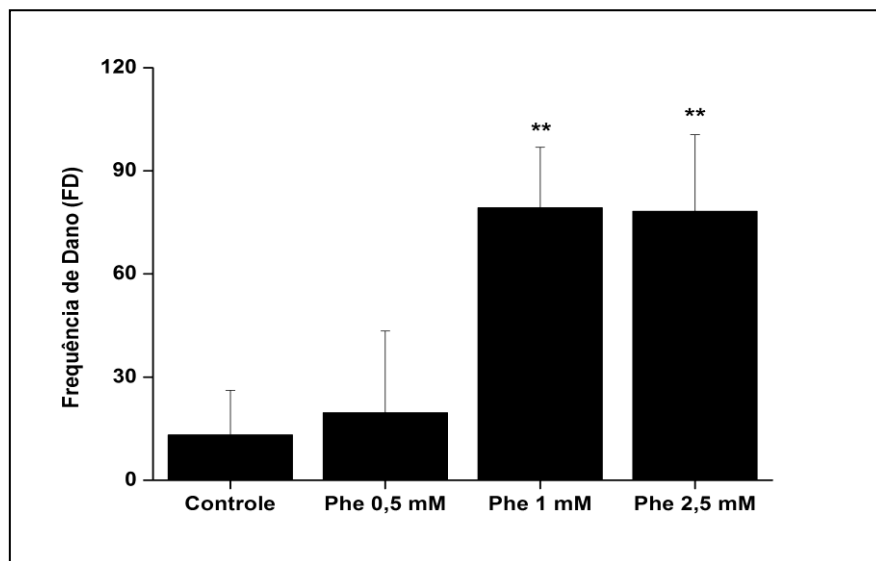


Figura 7 - Efeito in vitro da fenilalanina (Phe) sobre a frequência de dano ao DNA (FD) em córtex cerebral de ratos jovens. Os dados representam média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em unidades arbitrária (UA). * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA).

Em relação ao efeito de diferentes concentrações de fenilalanina em sangue, observamos que houve uma tendência ao aumento dos valores de ID e FD

na presença de 0,5 mM, a concentração mais baixa utilizada neste estudo. Entretanto, não houve diferença estatística, como demonstrado pelas Figuras 7 e 8.

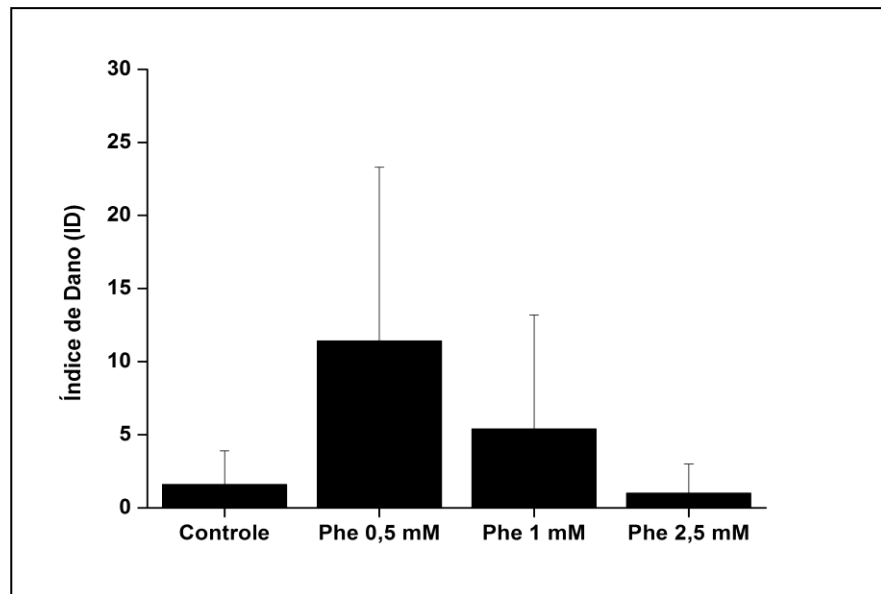


Figura 8 - Efeito in vitro da fenilalanina (Phe) sobre o índice de dano ao DNA (ID) em sangue periférico de ratos jovens. Os dados representam média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em unidades arbitrárias (UA). * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA).

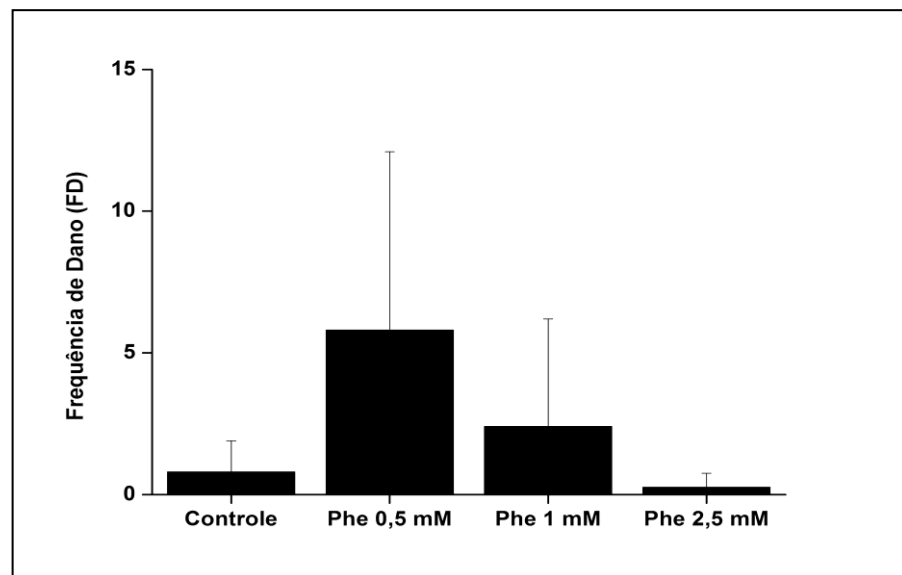


Figura 9 - Efeito in vitro da fenilalanina (phe) sobre a frequência de dano ao dna (fd) em sangue periférico de ratos jovens. os dados representam média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em unidades arbitrárias (ua). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (anova).

5 DISCUSSÃO

Modelos animais de PKU, induzidos através da administração de fenilalanina associada à p-clorofenilalanina, um inibidor da enzima PAH, são uma importante ferramenta no estudo dos efeitos do aminoácido fenilalanina, pois mimetizam as características dos pacientes fenilcetonúricos (Streck et al., 2000). Estudos utilizando modelos de hiperfenilalaninemia induzida pela administração de fenilalanina em ratos demonstraram que altos níveis deste aminoácido provocam uma inibição da atividade da enzima creatina quinase *in vitro* e reduzem a atividade da enzima *in vivo* (Costabeber et al., 2003), além de inibir a captação de glicose (Rodrigues et al., 1990), a via glicolítica (Lütz et al., 2003) e as atividades das enzimas Na⁺,K⁺-ATPase (Wyse et al., 1995) e piruvatoquinase (Feksa et al., 2002) no cérebro dos ratos. Além disso, estudos com pacientes fenilcetonúricos demonstraram uma inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase, uma enzima envolvida na terminação dos efeitos da acetilcolina durante a neurotransmissão colinérgica, em membrana de eritrócitos de pacientes (Tsakiris et al., 2002), bem como um aumento da lipoperoxidação e da produção de espécies reativas, e uma deficiência na capacidade antioxidante em eritrócitos (Sirtori et al., 2005).

Sabe-se que essas espécies altamente reativas têm o potencial de oxidar moléculas biológicas como DNA, proteínas e lipídios, causando dano e disfunção celular (Halliwell e Gutteridge, 2007). Recentemente, Sitta et al. (2009a) demonstraram que pacientes fenilcetonúricos não-tratados apresentam um maior índice de dano ao DNA em sangue periférico, o que parece estar associado a níveis elevados de fenilalanina. Entretanto, nada se sabe sobre o efeito genotóxico de elevados níveis de fenilalanina sobre o cérebro. Os pacientes acometidos por PKU apresentam sintomas essencialmente cerebrais, embora a enzima PAH, cuja

atividade está deficiente ou ausente na doença, seja hepática (Scriver e Kaufman 2001). Especula-se que o acúmulo de fenilalanina nos tecidos dos pacientes possa ser a causa do dano cerebral observado nos pacientes. Considerando que um estado de estresse oxidativo pode provocar danos oxidativos em ácidos nucleicos e que o mecanismo pelo qual pacientes acometidos por PKU apresentam maiores índices de dano ao DNA ainda é desconhecido, assim como o efeito de altas concentrações de fenilalanina em tecidos cerebrais, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os possíveis efeitos genotóxicos *in vivo* e *in vitro* de altas concentrações de fenilalanina em córtex cerebral e sangue periférico de ratos jovens através do ensaio cometa. Na versão alcalina (pH > 13) do ensaio cometa (eletroforese em gel de célula única), desenvolvido por Singh et al. (1988), o aumento da migração de DNA pode estar associado a sítios de reparo por excisão incompleto (Tice et al., 2000), que são gerados como um passo intermediário durante a ação de diferentes sistemas de reparo do DNA (Speit e Hartmann, 1995). Este ensaio possui uma série de vantagens em comparação com outros testes, sendo extremamente sensível para detectar baixos níveis de danos no DNA (Liao et al., 2009).

Inicialmente, observamos que há um aumento de dano ao DNA tanto em córtex cerebral quanto em sangue de animais submetidos a um modelo experimental de PKU induzido quimicamente através da administração de fenilalanina e de p-clorofenilalanina, um inibidor da enzima PAH, quando comparados ao grupo controle, sugerindo que um aumento nas concentrações teciduais de fenilalanina podem levar a dano de DNA tanto em estruturas cerebrais quanto em células do sangue. Tais resultados estão de acordo com os dados obtidos em sangue periférico de pacientes afetados pela PKU, descritos por Sitta e colaboradores (2009a).

Deve-se salientar que o DNA é um alvo particularmente importante para a oxidação, gerando várias classes de produtos (quebras da fita simples e da dupla fita), ligações cruzadas inter- e intra-fitas, ligações cruzadas DNA-proteínas, e produtos de fragmentação dos açúcares presentes no DNA. Os radicais livres podem atacar o DNA celular, causando lesões que vão desde dano às bases nitrogenadas e aos açúcares, à quebra do DNA e ligações cruzadas DNA-proteína (Cooke et al., 2006). Lesões em DNA podem dificultar os processos de transcrição e replicação, resultando em parada do ciclo celular, morte celular ou mutagênese, e seu envolvimento foi previamente descrito em várias doenças hereditárias, na carcinogênese, em doenças genéticas e no envelhecimento (Altieri et al., 2008; Sitta et al., 2009a).

Considerando que no conjunto de experimentos anteriormente descrito não é possível determinar se os efeitos podem ser atribuídos exclusivamente à fenilalanina *per se* ou a algum metabólito secundário deste aminoácido, nosso próximo passo foi investigar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de fenilalanina sobre parâmetros de dano ao DNA em córtex cerebral e sangue de animais. Foi observado que os efeitos *in vivo* se repetiram em fatias de córtex cerebral incubadas *in vitro* na presença de altas concentrações de fenilalanina (1 e 2,5 mM). Considerando que a enzima responsável pela metabolização da fenilalanina, a PAH, é uma enzima hepática, e que os experimentos foram conduzidos no cérebro dos animais, portanto na ausência da PAH, pode-se sugerir que a fenilalanina é o principal metabólito que provoca danos ao DNA nos pacientes, uma vez que, nas nossas condições experimentais, não ocorre a formação dos metabólitos secundários deste aminoácido em quantidades significativas.

Por outro lado, não houve dano significativo ao DNA em alíquotas de sangue incubadas com fenilalanina, embora haja uma tendência a aumento de dano ao DNA (índice e frequência de dano) na concentração mais baixa estudada (0,5 mM). Pode se especular que estes achados sejam observados em decorrência da morte celular induzida pelas altas concentrações de fenilalanina, que ocorreria como consequência ao dano ao DNA por ela causado. Para comprovar tal hipótese, é necessária a investigação de parâmetros que indiquem morte celular, como, por exemplo, a dosagem da atividade da enzima lactato desidrogenase extracelular, visto que esta enzima é liberada em caso de morte da célula com ruptura da membrana plasmática (Burtis et al., 2008).

Tomados em seu conjunto, esses resultados sugerem que a fenilalanina apresenta um importante efeito genotóxico em sangue periférico e cérebro de ratos. Cabe ressaltar que o cérebro apresenta maior suscetibilidade a danos ao DNA, pois seus mecanismos de reparos são menos efetivos e suas defesas antioxidantes são reduzidas em comparação a outros tecidos (Fairbairn et al., 1995; Schulpis et al., 2005).

Considerando que danos oxidativos a lipídeos e proteínas foram previamente descritos em modelos animais e pacientes afetados por PKU, é possível postular que o dano ao DNA observado no presente estudo seja consequência de uma produção excessiva de espécies reativas causada pela fenilalanina (Halliwell e Gutteridge, 2007). Espécies reativas podem levar a dano ao DNA por ataque direto às bases púricas e piridínicas e/ou ao açúcar desoxirribose, resultando em formação de adutos de DNA e quebra das fitas de DNA (Fairbairn et al., 1995).

Deve-se ressaltar que o ensaio cometa não é capaz de discriminar a etiologia dos danos ao DNA. No entanto, propomos que esse efeito possa ocorrer como consequência de um aumento na geração de radicais livres promovida pela fenilcetonúria, uma vez que vários estudos demonstraram que este aminoácido aumenta a geração de espécies reativas e o dano oxidativo à célula (Sitta et al., 2009b; Fernandes et al., 2010; Rocha e Martins, 2012). Esta hipótese é reforçada pelo trabalho publicado por Ercal et al. (2002), demonstrando que a peroxidação lipídica está aumentada em ratos geneticamente modificados para mimetizar a PKU, quando comparados a animais controles, enquanto que a relação glutatona reduzida/glutaciona oxidada está diminuída. Além disso, foi descrito que o dano oxidativo induzido pela administração de fenilalanina em ratos pode ser prevenida pela administração de melatonina, vitamina E e vitamina C (Martinez-Cruz et al., 2002). Neste cenário, produtos da peroxidação lipídica, como 4-hidroxyononal, são capazes de modificar as bases do DNA, promovendo a mutagênese (Markesbery e Lovell, 2006).

Concluindo, o presente trabalho fornece evidências experimentais de que altas concentrações de fenilalanina podem levar a dano ao DNA, corroborando assim resultados prévios que demonstram dano ao DNA em leucócitos de pacientes fenilcetonúricos (Sitta et al., 2009a). Portanto, no caso de os resultados apresentados aqui também ocorrerem no cérebro dos pacientes acometidos pela PKU, pode-se especular que danos ao DNA poderiam explicar, pelo menos em parte, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no característico dano neurológico apresentado pelos pacientes fenilcetonúricos.

REFERÊNCIAS

Agency for Healthcare Research and Quality – AHRQ. Adjuvant Treatment for Phenylketonuria (PKU). 2012; 56:343.

Altieri F, Grillo C, Maceroni M, Chichiarelli S. DNA damage and its repair: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*. 2008; 10:891-937.

Amorim T, et al. Aspectos clínicos da fenilcetonúria em serviço de referência em triagem neonatal da Bahia. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant*. 2005 out/dez, 5 (4): 457-462.

Andrade VM, TRO Freitas, Silva J. Comet Assay using mullet and sea catfish (*Netuna sp*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutat. Res.- Genet Toxicol. Environ Mutag*, 2004; 560: 57-67.

Aoki K, et al. Long-term follow-up study of patients with phenylketonuria detected by the newborn screening programme in Japan. *J. Inher. Metab. Dis*. 2007; 30:608.

Aragon MC, et al. Inhibition by L-phenylalanine of tyrosine transport by synaptosomal plasma membrane vesicles: Implications in the pathogenesis of phenylketonuria. *J. Neurochem*. 1982; 39:1185.

Bauman M L, Kemper T L. Morphologic and histoanatomic observations of the brain in untreated human phenylketonuria. *Acta Neuropathol*. 1982; 55:58.

Berg, J.M, Tymoczko JL, Stryer L. *Bioquímica*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2004.

Bick U, et al. Disturbed myelination in patients with treated hyperphenylalaninemia: Evaluation with magnetic resonance imaging. *Eur. J. Pediatr*. 1991; 150:185.

Blau N, et al. Phenylketonuria. *Lancet*. 2010; 376:1417-1427.

Bodner KE, et al. A volumetric study of basal ganglia structures in individuals with early-treated phenylketonuria. *Mol Genet Metab*, 2012 Nov;107(3):302-7.

Borrajo G J. Newborn screening in Latin America at the beginning of the 21st century. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2007; 30:466-481.

Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Atenção Básica, Departamento de Atenção Básica. Rastreamento. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

Brenneman A R, Kaufman S. The role of tetrahydropteridine in the enzymatic conversion of tyrosine to 3,4-dihydroxyphenylalanine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1964; 17:177.

Burtis CA, Ashwood ER, Bruns T. *Fundamentos de Química Clínica*. São Paulo (SP): Elsevier; 2006.

Capbell MK. *Bioquímica*. 3 ed. Ferreira HB, et al editores. Porto Alegre (RS). Artmed Editora, 2000.

Carvalho TM. Resultados do levantamento epidemiológico da sociedade brasileira de triagem neonatal (SBTN). *Rev. Med. Minas Gerais*. 2003; 13(1):S1 09-35

Chace D H, et al. Use of phenylalanine-to tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry to improve newborn screening for phenylketonuria of early discharge specimens collected in the first 24 hours. *Clin. Chem.* 1998; 44:2405-2409.

Christ S E, et al. Decreased functional brain connectivity in individuals with early-treated phenylketonuria: evidence from resting state fMRI. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2012; 10.

Christ S E, et al. Disruption of prefrontal function and connectivity in individuals with phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2010; 99:33-S40.

Cook PR, Brazell IA. Conformations constraints in nuclear DNA. *J. Cell Sci.* 1976; 22: 287 -302

Cook PR, Brazell IA. Spectrofluorometric measurement of the ethidium to supernelical DNA from cell nuclei. *Eur. J. Biochem.* 1978; 84: 465 – 477.

Costabeber E, et al. Hyperphenylalaninemia reduces creatine kinase activity in the cerebral cortex of rats. *Int J Dev Neurosci.* 2003; 21:111–6.

Di Paolo, C. Aplicação do Ensaio Cometa a estudo de Danos ao DNA de robalos, *centropomus parallelus* (Poly 1960) expostos à β -natioflavona [dissertação]. São Paulo: Instituto oceanográfico Universidade de São Paulo; 2006.

Ercal N, et al. Oxidative stress in a phenylketonuria animal model. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32(9):906-11.

Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res.* 1995; 339:35–59.

Feksa LR, et al. Alanine prevents the reduction of pyruvate kinase activity in brain córtex of rats subjected to chemically induced hyperphenylalaninemia. *Neurochem.* 2002; 27:947–952.

Fernandes CG, et al. Experimental evidence that phenylalanine provokes oxidative stress in hippocampus and cerebral cortex of developing rats. *Cell Mol Neurobiol.* 2010; 30(2):317-26.

Giovannini M, et al. Phenylketonuria: Dietary and therapeutic challenges. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2007; 30(2):145-152.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death. In Halliwell B, Gutteridge JMC, eds. *Free radicals in Biology and medicine*. New York: Oxford University Press. 2007; 220–236.

Hargreaves A, et al. Near-ultraviolet photolysis of b-phenylpyruvic acid generates free radicals and results in DNA damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2007; 89:110-116.

Herrero E, et al. Inhibition by L-phenylalanine of tryptophan transport by synaptosomal plasma membrane vesicles: Implications in the pathogenesis of phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1983; 6:32.

Hoeksma M, et al. Phenylketonuria: High plasma phenylalanine decreases cerebral protein synthesis. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2009; 96:177-182.

Jiang J, et al. A survey for the incidence of phenylketonuria in Guangdong, China. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*. 2003; 34:185.

Kaufman S. An evaluation of the possible neurotoxicity of metabolites of phenylalanine. *J. Pediatr.* 1989; 114:895.

Krause W, et al. Phenylalanine alters the mean power frequency of electroencephalograms and plasma dopa in treated patients with phenylketonuria. *Pediatr. Res.* 1986; 20:1112.

Langenbeck U, et al. Metabolic phenotypes of phenylketonuria. Kinetic and molecular evaluation of the Blaskovics protein loading test. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2009; 32:506-513.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Princípios de bioquímica*. 4^a ed. São Paulo: Sarvier; 2006

Levy H, et al. Congenital Heart Disease in Maternal Phenylketonuria: Report from the Maternal PKU Collaborative Study. *Pediatric Research*. 2001; 49(5)

Lütz MG, et al. Alanine prevents the in vitro inhibition of glycolysis caused by phenylalanine in brain cortex of rats. *Met Brain Dis.* 2003; 18: 87–94.

Markesbery WR, Lovell MA. DNA oxidation in Alzheimer's disease. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2006; 8:2039-2045.

Martinez-Cruz F, et al. Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: Prevention by melatonin, vitamin E, and vitamin C. *J Neurosci Res*. 2002; 15;69(4):550-8.

Martins AM, et al. Erros inatos do metabolismo: Abordagem Clínica. 2ª ed. Support; 2003. Doenças Relevantes do Grupo II Fenilcetonúria; [2012 dez 20]; p. 16-19. Disponível em: <http://www.supportnet.com.br/artigos/pdf/monografia.pdf>.

Marzzoco A, Torres BB. *Bioquímica Básica*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007.

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

McKean C M, Peterson N. A. Glutamine in the phenylketonuric central nervous system. *N. Engl. J. Med*. 1970; 283:1364.

McKean C . The effects of high phenylalanine concentrations on serotonin and catecholamine metabolism in the human brain. *Brain. Res*. 1972; 47:469.

Mira NVM, Marquez UML. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria (Diagnoses and treatment of phenylketonuria. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, SP, Brasil, 2000.

Momma S, et al. Phenylalanine transport across the blood-brain barrier as studied with the situ brain perfusion technique. *J. Neurochem*. 1987; 48:1291.

Moyle J J, et al. Meta-Analysis of Neuropsychological Symptoms of Adolescents and Adults with PKU. *Neuropsychol. Rev*. 2007; 17:91-101.

Monteiro LTB, Cândido LMB. Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos, Revista de Nutrição. Vol 19, nº 3, Campinas, May/June 2006

National institutes of health consensus development panel. National institutes of health consensus development conference statement: phenylketonuria: screening and management, October 16-18, 2000. Pediatrics. 2001; 108:972-982.

Pontoglio M, et al. Hepatocyte Nuclear Factor 1 Inactivation Results in Hepatic Dysfunction, Phenylketonuria, and Renal Fanconi Syndrome. Cell. 1996; 84:575-585.

Pangkanon S, et al. Detection of phenylketonuria by the newborn screening program in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2009 May; 40 (3): 525-9.

Ribeiro L R, et al (Org.). Genética – Mutagênese Ambiental. Canoas: Ed. ULBRA, 2003.

Rocha JC, Martins MJ. Oxidative stress in phenylketonuria: future directions. J Inherit Metab Dis. 2012; 35(3):381-98.

Rodrigues NR, et al. Effect of phenylalanine, p-chlorophenylalanine na α -methylphenylalanine on glucose uptake in vitro by the brain of young rats. Biochem Soc Trans. 1990; 18: 419–428.

Sanayama Y, et al. Experimental evidence that phenylalanine is strongly associated to oxidative stress in adolescents and adults with phenylketonuria. Mol Genet Metab. 2011; Mar 29.

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

Schoemans R, et al. Oligodendrocyte development and myelinogenesis are not impaired by high concentrations of phenylalanine or its metabolites. J. Inherit. Metab. Dis. 2010; 8.

Schulpis KH, et al. Low total antioxidant status is implicated with high 8-hydroxy-2-deoxyguanosine serum concentrations in phenylketonuria. *Clin Biochem.* 2005; 38: 239–242.

Scriver CR, et al. Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. In: Scriver, C. R. et al (Eds. Emeritus). *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease.* Chapter. 2008; 77:8.

Scriver, CR. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8. ed. McGraw-Hill Inc: New York, 2001.

Scriver CR, Kaufman S. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* New York: McGraw-Hill. 2001 1667–1724.

Shintaku H. The metabolic basis of the hyperphenylalaninemias and tyrosinemia. *Nihon Rinsho.* 1992; 50(7):1542-1547.

Silva J, et al. An alkaline single-cell gel eletrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genet Mol Biol.* 2000;23: 241–245.

Singh N, et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells . *Experimental research.* 1988; 175:184-191.

Sirtori L R, et al. Oxidative stress in patients with phenylketonuria. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2005; 1740:68-73.

Sirtori LR, et al. Oxidative stress in patients with phenylketonuria. *Biochim Biophys.* 2005; 1740: 68–73.

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.* 2009b; 27: 243–7.

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

Sitta, A. Investigação do estresse oxidativo em pacientes com fenilcetonúria não tratados e durante o tratamento dietético. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, 2007.

Speit G, Hartmann A. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis.* 1995; 10:555-559.

Streck EL, et al. Effect of phenylalanine and p-chlorophenylalanine on Na⁺, K⁺-ATPase activity in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats. *Metab Brain Dis.* 2000;15: 105–114.

Tice RR, et al. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000; 35: 306–221.

Trefz FK, et al. Differential diagnosis and significance of various hyperphenylalaninemias. In: Bickel H. & Watchtel U. Inherited diseases of amino acid metabolism. International Symposium. Heldeiberd. Stuttgart. Georg Thieme Verlag. 1984; 86.

Tsakiris S, et al. Reduced acetylcholinesterase activity in erythrocyte membranes from patients with phenylketonuria. *Clin Biochem.* 2002; 35: 615–619.

Vargas C R, et al. Oxidative stress in phenylketonuric patients. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2011; 104:97-99.

Villela, I V. Avaliação do Potencial Genotóxico de Amostras Ambientais na Região Hidrográfica da Bacia do Lago Guaíba. Tese de Doutorado Porto Alegre (RS), 2006.

Vogelstein B, et al. Supercoiled loops and eucaryotic DNA replication. *Cell,* 22: 79-85.

Wyse ATS, et al. Na⁺,K⁺-ATPase activity in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats subjected to chemically induced phenylketonuria. *Med Sci Res.* 1995; 23: 261–262.

Zhan JY, et al. Neonatal screening for congenital hypothyroidism and phenylketonuria in China. *World J. Pediatr.* 2009; 5:136-139.

Zhang Y, et al. Phenylalanine activates the mitochondria-mediated apoptosis through the RhoA/Rho associated kinase pathway in cortical neurons. *European Journal of Neuroscience.* 2007; 25:1341-1348.

ANEXOS

VAI AQUI O ANEXO