

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**ESTUDO CLÍNICO SOBRE A RELAÇÃO ENTRE FENILALANINA,
CITOCINAS, TETRAIDROBIOPTERINA E MARCADORES DE ESTRESSE
OXIDATIVO USANDO COMO MODELOS A DEFICIÊNCIA DE FENILALANINA
HIDROXILASE E A DEFICIÊNCIA DE PIRUVOIL TETRAIDROPTERINA
SINTASE**

Tássia Tonon

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Genética e Biologia Molecular**

Orientadora Prof.^a. Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Porto Alegre, abril de 2014.

INSTITUIÇÕES E FONTE FINANCIADORA

Este trabalho é fruto da cooperação entre várias instituições, a saber: Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Serviço de Genética Médica e Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), e Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). A etapa referente à análise de citocinas foi realizada no Laboratório Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences (BRAIN) e no Laboratório de Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA, com apoio financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do HCPA (FIPE-HCPA). A etapa correspondente às análises de marcadores de estresse oxidativo foi realizada no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da UNESC.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à minha orientadora, Prof.^a. Ida Vanessa Doederlein Schwartz, por toda compreensão e pelas oportunidades concedidas durante os dois anos em que trabalhamos juntas.

Aos meus pais, Italo e Sueli, e minhas irmãs, Thais e Ítala, pelo incondicional apoio em todas as decisões que até hoje segui em minha vida. Amo vocês.

Aos queridos amigos que conheci por meio do mestrado, Ana Paula Vanz, André Anjos, Bruna Pinheiro, Eduardo Mattos, Evelise Brizola, Fernanda Sperb, Filippo Vairo, Flavia Romariz, Gabriel Furtado, Kamila Castro, Karina Donis, Luiza Dorfman, Taciane Borsatto, Tatiane Vieira e Tatiele Nalin pelo carinho, alegria e apoio.

À minha amiga, Fernanda Bitencourt, pela bela e sincera amizade construída neste período.

Às amigas de Carazinho, Carolina Wallauer, Elisa Portella, Franciele Linck, Fernanda Ozorio, Franciele Zanetti, Giovana Viott, Giovana Suss e Monique Veit, pelos anos de convivência e amizade.

A toda equipe do Ambulatório de Tratamento de Distúrbios Metabólicos do Serviço de Genética Médica do HCPA pelo conhecimento proporcionado.

À professora Patricia Schuck e sua aluna Tamires Pavan pela disponibilidade nos momentos em que precisei.

Ao Fundo de Incentivo a Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo suporte financeiro.

À UFRGS, pela oportunidade de realizar o mestrado.

SUMÁRIO

INSTITUIÇÕES E FONTE FINANCIADORA.....	1
AGRADECIMENTOS.....	2
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 TETRAIDROBIOPTERINA.....	15
2.2 SÍNTESE DO BH4.....	16
2.3 BH4 NO TRATAMENTO DE DOENÇAS.....	18
2.3.1 DEFICIÊNCIA DE PAH.....	19
2.3.2 DEFICIÊNCIA DE BH4.....	21
2.4 MONITORAMENTO DO SISTEMA IMUNE NAS HIPERFENILALANINEMIAS.....	25
2.4.1 CITOCINAS.....	26
2.4.2 ESTRESSE OXIDATIVO.....	29
3 JUSTIFICATIVA.....	32
4 OBJETIVOS.....	33
4.1 OBJETIVO GERAL.....	34
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
REFERÊNCIAS.....	35
5 ARTIGO 1.....	42
6 ARTIGO 2.....	65
7 CONCLUSÕES.....	71
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	72
APÊNDICE I - COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE FENILALANINA,	

CITOCINAS E MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO APRESENTADAS NO PERÍODO BASAL (PONTO IA), PELOS PACIENTES COM DEFICIÊNCIA DE FENILALANINA HIDROXILASE RESPONSIVOS E NÃO RESPONSIVOS AO BH4.....	74
APÊNDICE II - COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE FENILALANINA, CITOCINAS E MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO APRESENTADAS NO PERÍODO APÓS SOBRECARGA DE L-PHE (PONTO IIA), PELOS PACIENTES COM DEFICIÊNCIA DE FENILALANINA HIDROXILASE RESPONSIVOS E NÃO RESPONSIVOS AO BH4.....	75
APÊNDICE III - COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE FENILALANINA, CITOCINAS E MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO APRESENTADAS NO PERÍODO APÓS SOBRECARGA DE L-PHE+BH4 (PONTO IIIA), PELOS PACIENTES COM DEFICIÊNCIA DE FENILALANINA HIDROXILASE RESPONSIVOS E NÃO RESPONSIVOS AO BH4.....	76
APÊNDICE IV - COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE FENILALANINA, CITOCINAS E MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO APRESENTADAS PELOS PACIENTES COM DEFICIÊNCIA DE FENILALANINA HIDROXILASE RESPONSIVOS AO BH4 NO PERÍODO APÓS SOBRECARGA DE L-PHE (PONTO IIA) E APÓS SOBRECARGA DE L-PHE+BH4 (PONTO IIIA).....	77
APÊNDICE V - COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE FENILALANINA, CITOCINAS E MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO APRESENTADAS PELOS PACIENTES COM DEFICIÊNCIA DE FENILALANINA HIDROXILASE NÃO RESPONSIVOS AO BH4 NO PERÍODO APÓS SOBRECARGA DE L-PHE (PONTO IIA) E APÓS SOBRECARGA DE L-PHE+BH4 (PONTO IIIA).....	78
ANEXO I - CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HCPA.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	Aldose Redutase
BH4	Tetraidrobiopterina
CR	Carbonil Redutase
DBH	Dopamina Beta Hidroxilase
DHPR	Diidropterina Redutase
EIM	Erro Inato do Metabolismo
GEMO	Gliceril Éter Monooxigenase
GSH	Glutaciona
GTP	Guanosina Trifosfato
GTPCHI	Guanosina Trifosfato Cicloidrolase I
HPA	Hiperfenilalaninemia
IL	Interleucina
NH ₂ TP	Diidroneopterina Trifosfato
NOS	Óxido Nítrico Sintase
PAH	Fenilalanina Hidroxilase
PCD	Pterina Carbinolamina Desidratase
PCDH	Pterina Carbinolamina Desidrogenase Hidroxilase
PCPA	4-cloro-DL-fenilalanina
Phe	Fenilalanina
PPH4	Piruvil Tetraidropterina

PTPS	Piruvil Tetraidropterina Sintase
qBH2	Quinonóide Diidrobiopterina
RN	Recém Nascido
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SOD	Superóxido Dismutase
SR	Sepiapterina Redutase
TH	Tirosina Hidroxilase
Th-1	T helper 1
Th-2	T helper 2
TPH	Triptofano Hidroxilase

LISTA DE FIGURAS

Corpo da dissertação

Figura 1. Enzimas dependentes de BH4 em humanos.....16

Figura 2. Síntese e regeneração do BH4.....17

Figura 3. Regulação dos níveis de BH4.....30

LISTA DE TABELAS

Corpo da dissertação

Figura 1. Nomenclatura das Deficiências de BH4.....25

RESUMO

Introdução: A compreensão do envolvimento do sistema imune na Deficiência de Fenilalanina Hidroxilase (PAH) e na Deficiência de Piruvil Tetraidropterina Sintase (PTPS), doenças genéticas que cursam com hiperfenilalaninemia (HPA) e cujos pacientes podem ser beneficiados pela administração de tetraidrobiopterina (BH4), é de fundamental importância haja vista que o estado inflamatório parece influenciar a síntese e a oxidação do cofator BH4. Ambas são consideradas erros inatos do metabolismo que cursam com déficit mental quando o diagnóstico e tratamento não são estabelecidos precocemente. A Deficiência de PAH, apesar de rara, é muito relevante para o Sistema Único de Saúde visto que pertence ao grupo de doenças incluídas no Programa Nacional de Triagem Neonatal.

Objetivo: Avaliar a relação entre BH4, fenilalanina (Phe), citocinas e marcadores de estresse oxidativo em uma amostra de pacientes brasileiros com Deficiência de PAH submetidos ao teste de responsividade ao BH4 e em pacientes com Deficiência de PTPS.

Métodos: Estudo transversal, controlado, com amostragem por conveniência. Foram incluídas amostras de plasma de 17 pacientes com Deficiência de PAH coletadas antes e 27 horas após a administração de L-Phe (100mg/kg) e após 27 horas da administração combinada de L-Phe+BH4 (100mg/kg de L-Phe e 20mg/kg de BH4), para medida dos níveis de Phe, citocinas e marcadores de estresse oxidativo. Nos pacientes com Deficiência de PTPS (n= 2), foram realizadas coletas antes e após 4 horas da administração de BH4 para análise dos mesmos parâmetros. Todas as amostras foram pareadas com indivíduos hígidos de acordo com sexo e idade. Para determinação das citocinas foi utilizado o kit Human Cytokine Magnetic 10-Plex Panel - Invitrogen™ (Luminex®), o qual disponibiliza as dosagens de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-8, IL6, TNF- α , IFN- γ e GM-CSF) e anti-inflamatórias (IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10). Em relação aos marcadores de estresse oxidativo, foram analisados o conteúdo

de Carbonilas e Sulfidrilas, a atividade da Superóxido Dismutase (SOD) e os níveis de Glutathiona (GSH).

Resultados: Os pacientes com Deficiência de PAH (mediana (IQ) de Phe basal= 236,0 (140-407,10) μ mol/L) apresentaram níveis elevados de 4/6 citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) assim como níveis aumentados de GSH em relação aos controles. Os pacientes responsivos e não responsivos ao BH4 não diferiram no período basal, após sobrecarga isolada de L-Phe e após sobrecarga combinada de L-Phe+BH4 em relação aos parâmetros analisados. Também, não foi observada diferença entre os pacientes com Deficiência de PAH Clássica e Leve na coleta basal. Aproximadamente 30% dos pacientes apresentavam excelente controle metabólico. Os pacientes com Deficiência de PTPS não apresentavam HPA e não diferiram dos controles em relação aos níveis de citocinas. Apesar de moderadas, obtivemos correlações negativas significativas entre os níveis de algumas citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-8 e TNF- α) com os níveis de Phe.

Conclusões: Os nossos dados sugerem que as citocinas são marcadores sensíveis do efeito biológico da HPA. A elevação dos níveis destas na Deficiência de PAH sugere um perfil inflamatório, mesmo entre pacientes considerados com bom controle metabólico e sem evidência de estresse oxidativo. Esta característica pode ser decorrente do aumento crônico dos níveis de Phe, talvez associado à deficiência relativa de BH4. Já os níveis de Phe encontrados nos pacientes com Deficiência de PTPS estavam dentro dos valores considerados normais para a população em geral, não sendo observada elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e, por consequência, inflamação. Em relação à correlação negativa encontrada, o presente estudo sugere que os níveis de Phe podem exercer algum efeito inibitório que resulte na diminuição da expressão de algumas citocinas. Assim, sugerimos que estudos adicionais sobre o efeito da administração crônica do BH4 em pacientes com Deficiência de PAH, tomando como desfecho os níveis de citocina, sejam realizados.

Abstract

Introduction: It is crucially important to understand the involvement of the immune system in the deficiencies of phenylalanine hydroxylase (PAH) and pyruvoyl tetrahydropterin synthase (PTPS), genetic diseases that present with hyperphenylalaninemia (HPA) and whose patients may benefit from the administration of tetrahydropterin (BH4), since inflammatory status may influence the synthesis and oxidation of the cofactor BH4. Both deficiencies are considered inborn errors of metabolism that cause mental deficits when diagnosis and treatment are not established early. Although being rare, PAH deficiency is extremely relevant for the Brazilian Unified Health System because it belongs to the group of diseases included in the National Neonatal Screening Program.

Objective: To evaluate the relationship between BH4, phenylalanine (Phe), cytokines, and markers of oxidative stress in a sample of Brazilian patients with PAH deficiency undergoing a test of responsiveness to BH4 and of patients with PTPS deficiency.

Methods: Controlled cross-sectional study with a convenience sampling strategy. We analyzed plasma samples of 17 patients with PAH deficiency collected before and 27 hours after the administration of L-Phe (100mg/kg) and 27 hours after the combined administration of L-Phe+BH4 (100mg/kg of L-Phe and 20mg/kg of BH4) to measure the levels of Phe, cytokines, and markers of oxidative stress. In patients with PTPS deficiency (n=2), samples were collected before and 4 hours after the administration of BH4 for the analysis of the same parameters. All samples were paired with healthy individuals according to sex and age. Cytokine levels were determined using the Human Cytokine Magnetic 10-Plex Panel kit (Invitrogen™) for the Luminex® platform, which provides the doses of proinflammatory (interleukin 1 β [IL-1 β], IL-8, IL6, tumor necrosis factor α [TNF]- α , interferon γ [IFN- γ], and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor [GM-CSF]) and anti-inflammatory (IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10) cytokines. Additionally, the following markers of oxidative stress were analyzed: content of carbonyls and sulfhydryls, activity of superoxide dismutase, and levels of glutathione (GSH).

Results: Patients with PAH deficiency (median [interquartile range] for baseline Phe levels=236.0 [140-407.10] $\mu\text{mol/L}$) showed increased levels for 4/6 proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α), as well as increased GSH levels compared to controls. Patients who were responsive and unresponsive to BH4 did not differ at baseline, after isolated L-Phe overload, and after combined overload of L-Phe+BH4 in terms of the parameters analyzed in this study. Similarly, no difference was observed between patients with classical and mild PAH deficiency at baseline. Nearly 30% of patients had excellent metabolic control. Patients with PTPS deficiency did not present with HPA and did not differ from controls in terms of cytokine levels. Although moderate, significant negative correlations were found between the levels of some proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-8, and TNF- α) and Phe levels.

Conclusions: Our data suggest that cytokines are extremely sensitive biomarkers of the biological effect of HPA. The increase in cytokine levels in PAH deficiency suggests an inflammatory profile even among patients considered as having good metabolic control and showing no evidence of oxidative stress. This characteristic may result from the chronic increase in Phe levels, which may be associated with relative BH4 deficiency. On the other hand, Phe levels found in patients with PTPS deficiency were within values considered normal for the general population; additionally, no increase in proinflammatory cytokine levels was observed, and therefore no inflammation was observed as well. With regard to the negative correlation found, the present study suggests that PhE levels may exert some inhibitory effect that results in the decreased expression of some cytokines. Therefore, we suggest that additional studies on the effect of the chronic administration of BH4 in patients with PAH deficiency should be conducted, considering cytokine levels as outcomes.

1 INTRODUÇÃO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são doenças genéticas caracterizadas pela síntese alterada de proteínas, geralmente enzimas, cujas atividades funcionais encontram-se reduzidas ou até mesmo nulas. Essa deficiência/ausência de atividade enzimática pode ocasionar bloqueios metabólicos com conseqüente acúmulo de substrato, intensificação de via secundária, diminuição de intermediários da via primária e de seu produto final (Scriver e Kaufman, 2001; Saudubray et al., 2006). Atualmente, são descritos mais de 700 EIM, que são raros quando analisados isoladamente, mas com frequência global estimada de 1:2.500 nascidos vivos (Soliz et al., 2007; Pampols, 2010).

De modo geral, os EIM são doenças graves que podem cursar com sérios problemas neurológicos e até mesmo com a morte de indivíduos afetados. Contudo, ao contrário de outras doenças genéticas, muitos EIM são passíveis de tratamento (Giugliani, 1998), como no caso das Hiperfenilalaninemias (HPAs). Os primeiros casos de HPAs foram relatados em 1934, por Absbjorn Folling ao observar dois irmãos com retardo mental (Scriver e Kaufman, 2001). Bioquimicamente, as HPAs podem ser decorrentes da deficiência da enzima fenilalanina hidroxilase (Deficiência de PAH ou Fenilcetonúria) ou das enzimas envolvidas na síntese ou regeneração do cofator tetraidrobiopterina (BH4) (Blau et al., 2010).

A HPA causada por Deficiência de PAH é o EIM dos aminoácidos mais prevalente, com incidência em torno de um (01) caso para cada 10.000 recém-nascidos (RN) (Blau et al., 2010). A PAH catalisa a conversão do aminoácido fenilalanina (Phe) à tirosina (Tyr) por meio de uma reação dependente de BH4, ferro e oxigênio molecular (Scriver and Kaufman, 2001). Níveis elevados de Phe são tóxicos ao cérebro, havendo, em conseqüência, comprometimento neurológico progressivo (Blau et al., 2010). Dessa forma, o tratamento consiste em uma dieta restrita em Phe juntamente com a suplementação de uma fórmula metabólica rica nos demais aminoácidos (Plasencia et al., 2009). Em 1999, foi

descrito um grupo de pacientes responsivos à administração oral de BH4. Esse cofator foi caracterizado como uma chaperona com a finalidade de reduzir os níveis de Phe por meio da otimização da atividade residual da enzima PAH (Kure et al., 1999).

Os defeitos envolvidos na biossíntese do cofator BH4 apresentam-se mais raros, com incidência estimada em 1 a 2% de todos os casos de HPA (Blau et al., 2010). Essas desordens apresentam não somente níveis elevados de Phe, como também redução da biossíntese de neurotransmissores visto que a Tyr é um aminoácido precursor de diversas substâncias-chave. O tratamento precoce com administração de BH4 ou dieta restrita em Phe, e de L-dopa/carbidopa e 5-hidroxitriptofano evita disfunção neurológica progressiva e mantém os níveis de Phe dentro dos valores de referência (Blau e Burgard, 2006; Longo, 2009).

É descrito na literatura que o aumento das concentrações de Phe acarreta no aumento de marcadores da ativação imune e inflamação (Zoller et al., 2012). Na Deficiência de PAH, o que se sabe é que pacientes que não estão sob tratamento dietético rigoroso têm níveis elevados de uma citocina pró-inflamatória (TNF- α) (Schulpis et al., 2005). Também, na ausência da Deficiência de PAH geneticamente determinada, é conhecida a relação de algumas citocinas pró-inflamatórias como estimuladoras da síntese de BH4 em vários tipos celulares com conseqüente aumento da biossíntese de neurotransmissores (Thony, 2006). Já a redução dos níveis de BH4/neurotransmissores e aumento dos níveis de Phe podem ser devido à produção de espécies reativas de oxigênio e conseqüente processo de estresse oxidativo (Neurauter et al., 2008; Capuron et al., 2011).

Considerando esses comentários, esta dissertação tem como objetivo avaliar a relação entre BH4, Phe, citocinas e marcadores de estresse oxidativo nos pacientes atendidos no Ambulatório de Tratamento de Distúrbios Metabólicos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínica de Porto Alegre (ATDM-SGM/HCPA) com Deficiência de PAH submetidos ao teste de responsividade ao BH4 e em pacientes com Deficiência de BH4 que estão em uso crônico deste cofator.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TETRAIDROBIOPTERINA

O BH4 pertence à família das pteridinas, subgrupo das pterinas (Machado, 2012) presente em quase todos os tecidos de organismos vivos. Em 1889, foram isolados os primeiros derivados pteridínicos naturais a partir de asas de borboletas, sendo esses pigmentos quimicamente relacionados às purinas que, em solução neutra, exibem fluorescência (Curtius, 2006).

O BH4 tem sua função melhor estabelecida como cofator endógeno para a atividade de diversas enzimas como também para algumas funções a nível celular ainda em processo de esclarecimento. Além disso, dependendo da sua concentração e do tipo de célula em que se encontra, esse pode atuar tanto na proliferação celular como na apoptose (Thony, 2006).

Dentre as enzimas conhecidas que utilizam o BH4 como cofator, citam-se: a Fenilalanina Hidroxilase (EC 1.14.16.1; PAH), a Tirosina Hidroxilase (EC 1.14.16.3; TH), a Triptofano Hidroxilase (EC 1.14.16.4; TPH), a Óxido Nítrico Sintase (EC 1.14.13.39; NOS), a Gliceril Éter Monooxigenase (EC 1.14.16.5; GEMO) (Thony, 2006) (Figura 1) e a Dopamina beta Hidroxilase (EC 1.14.17.1; DBH) (Casanova e Muñoz, 2006).

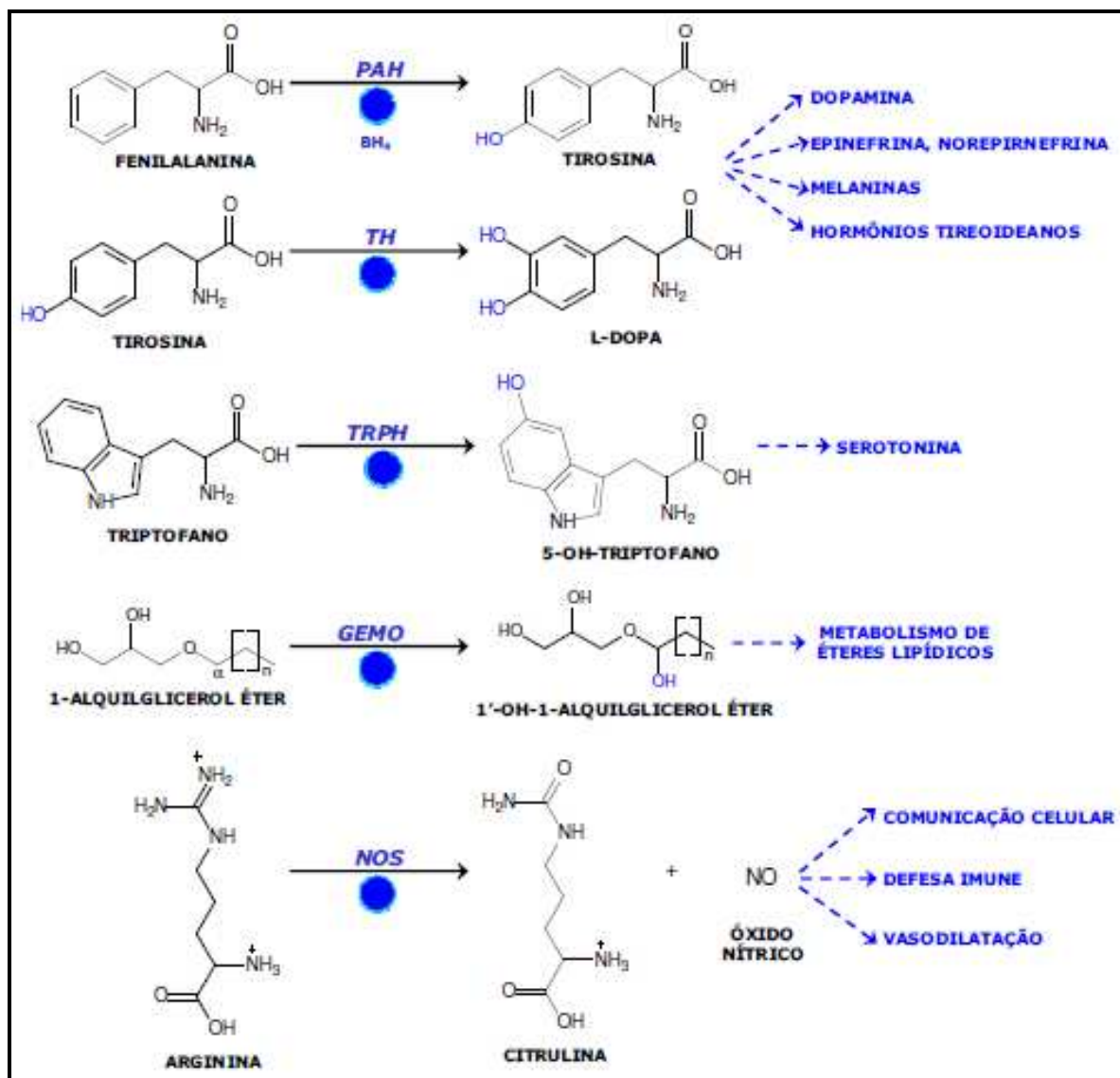


Figura 1 - Enzimas dependentes de BH_4 em humanos. PAH: Fenilalanina Hidroxilase; TH: Tirosina Hidroxilase; TRPH: Triptofano Hidroxilase; GEMO: Gliceril Éter Monooxigenase; NOS: Óxido Nítrico Sintase. Fonte: Machado, 2012.

2.2 SÍNTESE DO BH_4

O BH_4 é sintetizado no citoplasma das células, processo que é realizado por três diferentes enzimas (Figura 2). Assim, a primeira enzima a atuar é a Guanosina Trifosfato Cicloidrolase I (EC 3.5.4.16; GTPCHI), que catalisa a conversão de Guanosina Trifosfato (GTP) em Diidroneopterina Trifosfato

(NH₂TP). Na segunda etapa, a enzima Piruvil Tetraidropterina Sintase (EC 4.6.1.10; PTPS) catalisa a conversão de NH₂TP a 6-Piruvil Tetraidropterina (PPH₄). A terceira e última etapa da síntese inclui a enzima Sepiapterina Redutase (EC 1.1.1.153; SR), a qual catalisa a conversão de PPH₄ em BH₄. Apesar da SR ser suficiente para completar a síntese do BH₄, outras redutases alternativas podem atuar na redução do BH₄, incluindo a Aldose Redutase (EC 1.1.1.21; AR), e a Carbonil Redutase (EC 1.1.1.184; CR) (Casanova e Muñoz, 2006).

O processo de regeneração do BH₄ acontece através da desidratação deste cofator à Pterina-4-Carbinolamina Desidratase (PCD) de forma não enzimática. Após isto, a PCD é convertida à Quinonoide Diidrobiopterina (qBH₂) por meio da enzima Pterina-4-Carbinolamina Desidrogenase Hidroxilase (EC 4.2.1.96; PCDH). A última enzima a atuar no processo de regeneração é a Dihidropterina Redutase (EC 1.6.99.7; DHPR), convertendo qBH₂ em BH₄ (Figura 2) (Casanova e Muñoz, 2006).

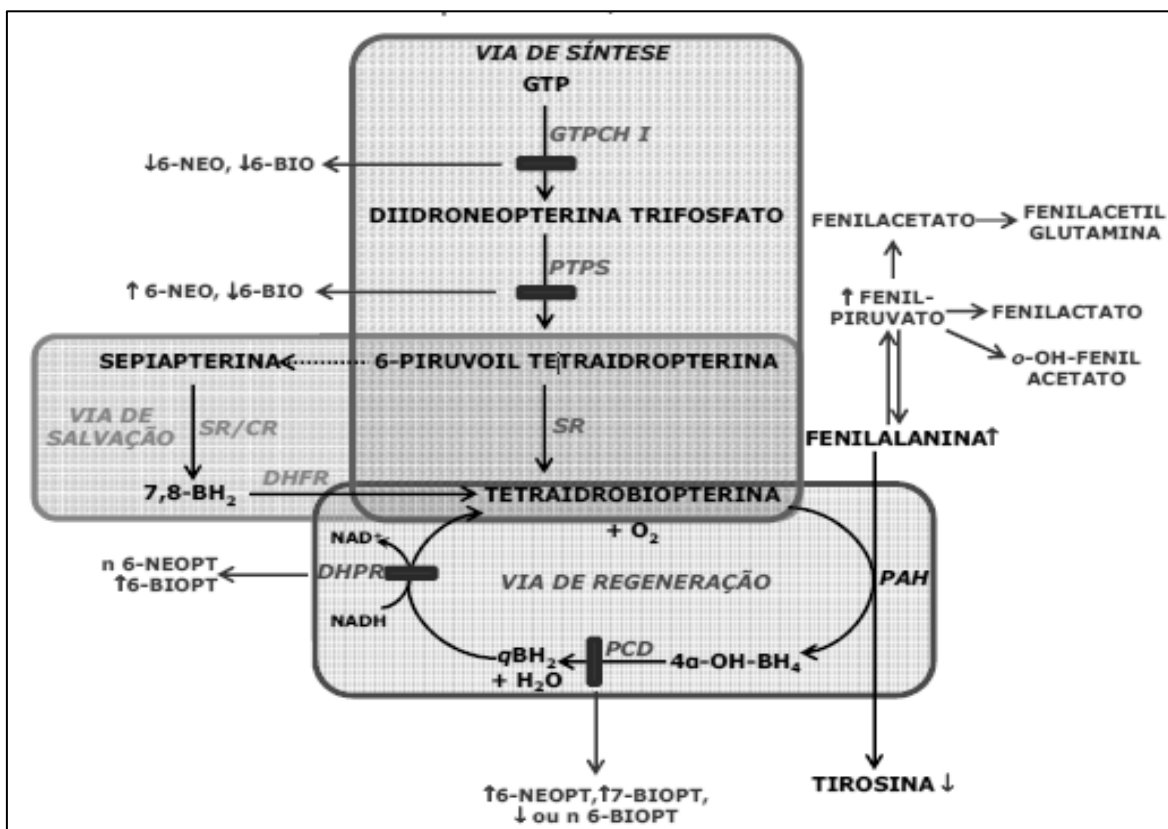


Figura 2 – Síntese e regeneração do BH₄. GTP: Guanosina Trifosfato; GTPCHI: Guanosina Trifosfato Ciclodrolase I; PTPS: Piruvil Tetraidrobiopterina Sintase; SR: Sepiapterina Redutase; PCD: Pterina 4 α -carbinolamina Desidratase; DHPR: Dihidropteridina Redutase; CR: Carbonil

Redutase; PAH: Fenilalanina Hidroxilase; NEO: Neopterinina; BIO: Biopterina; n: normal. Fonte: Machado, 2012.

A regulação da síntese do BH4 acontece de forma complexa, sendo que a expressão das enzimas envolvidas varia conforme o tipo de célula e tecido em que se encontram. Em algumas regiões do organismo, como no fígado e em regiões do cérebro, por exemplo, todas as enzimas encontram-se expressas. Já em outros tecidos a expressão de algumas enzimas pode ser induzida ou está completamente ausente (Thony, 2006).

Estudo realizado por Curtius (2006) mostra que os níveis de BH4 são primeiramente influenciados pela atividade da enzima GTPCHI, esta qual resulta na produção de BH4, indicando a enzima como potente indutor na modulação dos níveis deste cofator. Assim, percebe-se que a baixa disponibilidade de BH4 pode resultar de uma expressão limitada de GTPCHI (Meininger et al., 2000).

2.3 BH4 NO TRATAMENTO DE DOENÇAS

Após a análise de todas as enzimas dependentes de BH4 e das vias metabólicas envolvidas, torna-se indiscutível a relação entre inúmeras doenças e alterações nos níveis de BH4. Inicialmente, citam-se as HPAs como o primeiro grupo de doenças que sugeriu o BH4 como terapia (Curtius, 2006). Também, outras doenças associam-se com os níveis de BH4 como doenças cardiovasculares (Cunnington et al., 2010), neurodegenerativas (Curtius et al., 1984), depressão (Bottiglieri et al., 1992) e autismo (Tani et al., 1994).

A HPA é o termo que engloba o fenótipo bioquímico caracterizado pelo aumento dos níveis séricos do aminoácido Phe. A HPA é definida como o valor de Phe plasmática maior que 120 $\mu\text{mol/L}$ (Plana et al., 2006). Diversas são as causas descritas que podem gerar HPA, podendo ser elas a Deficiência de PAH; as Deficiências de BH4; as deficiências transitórias devido à prematuridade do bebê; doenças hepáticas quando existe uma alta ingestão de proteínas; consumo

de alguns medicamentos como metotrexato e trimetoprim e doença renal (Smith e Lee, 2000).

2.3.1 DEFICIÊNCIA DE PAH

A Deficiência de PAH foi descrita pela primeira vez por Asbjörn Fölling em 1934, ao observar dois irmãos com retardo mental. Além de ser uma das primeiras doenças neurogenéticas identificadas, foi o primeiro EIM tratado com sucesso (Zschocke e Hoffmann, 2004). Essa doença é causada pela deficiência da enzima PAH que tem como função converter o aminoácido Phe em Tirosina (Tyr) por meio de uma reação dependente de BH₄, ferro e oxigênio molecular (Scriver e Kaufman, 2001). O gene codificador da enzima está localizado no braço longo do cromossomo 12 (12q24.1), sendo descritas aproximadamente 500 mutações diferentes (Walter et al., 2006).

A prevalência mundial da Deficiência de PAH varia amplamente em todo o mundo. Na Europa, a prevalência é em torno de um (01) caso para cada 10.000 recém-nascidos (RN) (Blau et al., 2010), mas é possível ver números de 1:1.000.000 RN na Finlândia e 1:4.200 RN na Turquia (Walter et al., 2006). Em 2002, um estudo realizado por Carvalho et al (2003) sugeriu que a incidência em nosso país é estimada em 1:24.780 RN. Já na região sul do Brasil, dois (02) estudos foram realizados, um com incidência de 1:12.500 RN (Jardim et al., 1996) e outro que apresenta incidência de 1:16.483 RN (Sommer et al., 2006).

Segundo Blau et al (2010), a Deficiência de PAH pode ser dividida em Clássica, Leve ou Hiperfenilalaninemia. Esta classificação é baseada nos níveis de Phe antes de qualquer intervenção dietética/tratamento: níveis de Phe acima de 1200µmol/L classificada como Clássica; níveis de Phe entre 600-1200µmol/L classificada como Leve; e níveis de Phe entre 120-600µmol/L classificada como Hiperfenilalaninemia.

Contudo, essa classificação nem sempre é fidedigna, visto que os níveis de Phe são medidos em recém-nascidos, o que implica em atingir os níveis máximos

desse aminoácido no sangue. Também, a classificação pode ser realizada conforme a tolerância de Phe da dieta, esta qual nem sempre é fácil de medir.

A Phe é um aminoácido essencial para o organismo, utilizada principalmente para a síntese de proteína tecidual e formação de Tyr, esta última responsável pela biossíntese de neurotransmissores como a dopamina e norepinefrina (Elsas e Acosta, 2003; Lehninger, 2004). Quando a hidroxilação para Tyr é impedida, a Phe acumula sendo transaminada com piruvato produzindo o metabólito fenilpiruvato, uma fenilcetona tóxica ao cérebro. É descrito que os níveis aumentados de Phe no cérebro podem prejudicar funções neurofisiológicas através de vários mecanismos (Blau et al., 2010).

O diagnóstico da Deficiência de PAH deve ser feito no período neonatal. Uma gota de sangue é coletada do calcanhar do recém-nascido em papel filtro e, após isso, analisado pela determinação da concentração de Phe. A amostra para a triagem neonatal deve ser coletada após a alimentação com alimentos fontes de proteína. Se o resultado for alterado, ele deverá ser repetido. O novo teste é acompanhado da análise quantitativa da concentração de Phe e de Tyr no sangue, confirmando a HPA (Nyhan e Ozand, 1998). No Brasil, o diagnóstico, o tratamento e o acompanhamento dessa doença são preconizados desde 2001 por meio do Programa Nacional de Triagem Neonatal (Brasil, 2002).

Ao nascimento, o paciente parece normal, sendo que alguns sintomas podem ser vistos nos primeiros dias de vida como irritabilidade, eczema e odor incomum, entretanto, a manifestação mais importante nesses pacientes é o déficit mental (Nuhan e Ozand, 1998). Ainda podem ser descritos diminuição da pigmentação de cabelo, pele e íris, crescimento reduzido, microcefalia e comprometimento neurológico. Também podem ser vistos problemas comportamentais que incluem hiperatividade, agressividade e ansiedade (Walter et al., 2006). Nos últimos anos, o diagnóstico precoce e o tratamento imediato tem permitido evitar o déficit intelectual em muitas crianças com Deficiência de PAH (Blau et al., 2010).

O tratamento consiste em uma dieta restrita em Phe, sugerida desde os trabalhos pioneiros de Bickel em 1953, idealmente no primeiro mês de vida. Assim, os níveis sanguíneos desse aminoácido diminuem e evita-se o dano

neurológico naqueles que tem diagnóstico precoce. Contudo, como a alimentação desses pacientes se torna pobre de proteínas de alto valor biológico, esta é geralmente complementada com a utilização de uma fórmula metabólica que contém uma mistura de micronutrientes e aminoácidos livres isenta de Phe (Plasencia et al., 2009).

Apesar do tratamento com dietas restritas em Phe ser bem-sucedido, a pobre palatabilidade da mesma gera falta de cumprimento da dieta, principalmente por adolescentes e adultos (Mitchell e Scriver, 2007). Com isso, novas terapias surgiram ao longo dos anos, sendo uma delas a administração de BH4, que tem como objetivo melhorar a tolerância de Phe da dieta (Mitchell e Scriver, 2007). *Sapropterin dihidroclorato (Kuvan®, Biomarn Pharma)* é uma forma sintética oral do BH4, considerada uma terapia segura e eficaz em pacientes com Deficiência de PAH que respondem positivamente a testes de sobrecarga com BH4 (Burnett et al, 2007).

Em 1999, quatro pacientes com Deficiência de PAH que responderam à administração de BH4 por via oral foram descritos tendo como resultado a diminuição acentuada da concentração de Phe no sangue abrindo novas possibilidades terapêuticas para os indivíduos afetados. A partir desse momento, vários estudos têm confirmado esta conclusão (Bernegger e Blau, 2002; Muntau et al., 2002; Matalon et al., 2004; Hennermann et al., 2005; Nalin et al., 2011). O número de pacientes com Deficiência de PAH responsivos ao BH4 varia no mundo inteiro, sendo que Zurfluh et al (2009) mostra que aproximadamente 55% dos pacientes europeus apresentam fenótipo responsivo à administração de BH4. Outros estudos sugerem que a responsividade ao BH4 é maior em pacientes com as formas mais leves quando comparados com as formas graves da doença, uma vez que a atividade residual da PAH é maior nas formas mais amenas. Assim, Blau et al (2009a) descrevem como sendo 50% dos pacientes com Deficiência de PAH leve responsivos ao BH4 e menos de 10% das formas mais graves responsivos ao BH4 (Blau et al., 2009a). A responsividade geralmente é considerada como redução de pelos menos 30% dos níveis dos níveis de Phe após 24 horas do teste de sobrecarga com BH4 (Blau et al., 2009b).

2.3.2 DEFICIÊNCIA DE BH4

A Deficiência de BH4 pertence a um grupo de doenças heterogêneas sendo que suas variantes são definidas e caracterizadas por meio de diferentes critérios clínicos e bioquímicos. Seu defeito surge de uma mutação nos genes codificadores de qualquer uma das enzimas envolvidas na produção de BH4 afetando não somente o metabolismo hepático da PAH, resultando em HPA, como também na biossíntese de neurotransmissores do Sistema Nervoso Central, resultando na deficiência de norepinefrina, dopamina e serotonina (Blau, 2006).

Segundo Blau (2006), o defeito enzimático, a severidade, o tipo de mutação e a resposta à terapia são um dos critérios usados para definir o tipo de Deficiência de BH4. Esses são classificados em grave ou leve conforme for o tratamento com neurotransmissores.

Os primeiros pacientes descritos com HPA dependentes de BH4 foram identificados, em 1969, por Tada por meio dos programas de triagem neonatal realizados para o diagnóstico da Deficiência de PAH. A maioria desses pacientes diagnosticados precocemente apresentava uma deterioração cerebral progressiva apesar de terem um diagnóstico precoce para HPA e um controle dietético eficiente em relação aos níveis de Phe no sangue, sendo na época chamada de Deficiência de PAH Maligna (Nyhan et al., 2005).

Mais tarde descobriu-se que essa deterioração cerebral ocorre devido às enzimas dependentes de BH4 como TH e TPH, as quais são precursoras da biossíntese de neurotransmissores, gerando deficiência dos mesmos, justificando assim os sintomas neurológicos nestes pacientes (Casanova e Muñoz, 2006; Hyland, 2006).

Os defeitos envolvendo as enzimas da síntese de BH4 são transmitidos com padrão de herança autossômico recessivo, exceto a Deficiência da enzima GTPCHI, que pode ser transmitida tanto com padrão de herança autossômico recessivo como dominante (Blau, 2006; Longo, 2009).

Os genes das enzimas GTPCH, PTPS, PCD estão localizados no braço longo dos cromossomos 14, 11 e 10, sendo descritas aproximadamente 100, 46 e 9 mutações diferentes, respectivamente. Já os genes das enzimas DHPR e SR estão localizados no braço curto dos cromossomos 4 e 2, sendo descritas 34 e 19 mutações diferentes, respectivamente (Longo, 2009).

De acordo com a literatura, a Deficiência de BH4 é estimada em 1 a 2% de todos os casos de HPA, sendo estabelecida, portando, uma frequência de 1:500.000 a 1:1.000.000 nascimentos (Longo, 2009). Em países como Turquia e Arábia Saudita, as frequências apresentam-se mais elevada devido à consanguinidade (Blau, 2006). As mutações no gene da enzima PTPS são as mais frequentes, representando 60% das Deficiências de BH4, seguida por DHPR (30%) e as menos frequentes GTPCH e PCD, 5% cada (Longo, 2009). No Brasil, até o presente momento, nenhum estudo estimou a incidência no país, porém sabe-se que na região sul a incidência da Deficiência de PTPS é de 1: 400.000 nascimentos (Jardim et al., 1994).

Como essa deficiência pertence a um grupo de doenças que pode ser detectada, porém não identificada na triagem neonatal para Deficiência de PAH, uma triagem específica se torna essencial em todos os neonatos com dosagens de Phe acima de 120 $\mu\text{mol/L}$, assim como em todas as crianças que apresentam sinais e sintomas neurológicos (Opladen et al., 2012).

A maioria dos tipos de Deficiência de BH4 tem os seus níveis de Phe elevados ao nascimento, exceto na forma dominante do defeito enzimático da enzima GTPCH e na deficiência da enzima SR, esses os quais apresentam seus níveis de Phe normais ou minimamente alterados, dificultando o diagnóstico precoce (Longo, 2009) (Tabela 1).

A análise do perfil de pterinas em fluídos biológicos dos pacientes é extremamente importante para o direcionamento do diagnóstico e do tratamento. Atualmente o padrão ouro para diagnóstico dessas deficiências é a análise de pterinas, a atividade da enzima DHPR e a dosagem de aminoácidos (Opladen et al., 2012).

Em relação aos sintomas, esses podem se manifestar nas primeiras semanas de vida, porém, geralmente se notam em torno do quarto mês. Os

aspectos clínicos esperados são devido à deficiência de hidroxilação da Phe, a deficiência da síntese de neurotransmissores e a deficiência da síntese dos tetraidrofolatos (Casanova e Muñoz, 2006). Assim, o tratamento da Deficiência de BH4 visa normalizar os níveis de Phe, os neurotransmissores cerebrais e a correção de outras deficiências químicas (Longo, 2009).

A dieta restrita em Phe é efetiva para normalizar os níveis sanguíneos, contudo, na maioria dos casos, isso não é necessário, visto que a administração de BH4 aumenta a atividade da enzima PAH no fígado normalizando os níveis de Phe. O efeito do BH4 é imediato, reduzindo os níveis de Phe em 3-4 horas. Entretanto, existem pacientes que não respondem ao BH4, como no caso da Deficiência de DHPR, necessitando assim de dieta restrita em Phe (Longo, 2009) (Tabela 1).

Na teoria, a administração de BH4 pode também normalizar os níveis de neurotransmissores no cérebro. Porém, apenas com doses muito altas isto seria possível, não sendo suficiente para sustentar a síntese apropriada destes em pacientes com alguma das formas de Deficiência de BH4. Por essa razão, a administração de precursores de neurotransmissores ou inibidores de sua degradação como L-dopa/carbidopa devem ser iniciados logo após o diagnóstico. Também, em alguns casos, como na Deficiência de DHPR, deve ser administrado ácido fólico, pois a terapia com neurotransmissores pode diminuir os níveis de folatos no cérebro (Longo, 2009) (Tabela 1).

Tabela 1 - Nomenclatura das Deficiências de BH4

Defeito Enzimático	Padrão de Herança	Fenótipo	HPA	Tratamento
Def. GTPCH	Autossômico recessivo	Grave	Sim	NT+BH4
Def. GTPCH	Autossômico dominante	Grave	Não	L-Dopa/Carbidopa
Def. PTPS	Autossômico recessivo	Grave	Sim	NT+BH4
Def. PTPS	Autossômico recessivo	Leve	Sim	BH4
Deficiência de SR	Autossômico recessivo	Grave	Não	NT
Def. PCD	Autossômico recessivo	Leve	Sim	BH4
Def. DHPR	Autossômico recessivo	Grave	Sim	NT+dieta+Ácido Folínico
Def. DHPR	Autossômico recessivo	Leve	Sim	Dieta

NT: L-Dopa/Carbidopa/5-OH-Trp; Dieta: baixo teor de Phe. Fonte: Blau, 2006.

2.4 MONITORAMENTO DO SISTEMA IMUNE NAS HIPERFENILANINEMIAS

A expressão das enzimas envolvidas na síntese do BH4 pode ser regulada por diversos fatores, dentre eles, hormonais (estrogênio e insulina), nutricionais (Phe e arginina), terapêuticos (estatina e ciclosporina A), substâncias derivadas do endotélio (H₂O₂ e fator de crescimento de fibroblastos) e imunológicos (citocinas) (Shi et al., 2004).

2.4.1 CITOCINAS

As citocinas são um grupo de proteínas solúveis, de baixo peso molecular, secretadas por linfócitos e outros tipos celulares do corpo, responsáveis por atuar na comunicação entre as diversas células do sistema imunológico em resposta a vários estímulos específicos, sendo sua secreção um evento breve (Kindt et al., 2007).

Caracterizadas como mensageiras desse sistema, essas proteínas auxiliam na regulação da intensidade e na duração da resposta imunológica pela estimulação ou inibição por meio da ativação, da diferenciação e da proliferação de diversas células. Constituem ainda importante ação sobre a regulação do crescimento de células, reparo tecidual, secreção de anticorpos e outras citocinas, indução da resposta inflamatória e na regulação da hematopoiese (Guimarães e Scroferneker, 2007).

As citocinas dividem-se em grupos as quais são nomeadas conforme sua origem, sua estrutura ou sua ação, sendo elas as interleucinas (IL), as quimiocinas, os interferons, os fatores estimuladores de colônias, os fatores de crescimento e os fatores de necrose tumorais. Em relação à sua ação, dividem-se em dois grandes grupos: as citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α e IFN- γ) que ativam os macrófagos, células NK, células T e B e as citocinas anti-inflamatórias (IL-1RA, IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β) as quais reduzem a resposta inflamatória por meio da diminuição das citocinas pró-inflamatórias e da supressão de monócitos (Remick, 2003).

Além disso, as citocinas também são classificadas pela fonte de produção do linfócito, sendo T helper 1 (Th-1) ou T helper 2 (Th-2). Os linfócitos Th1 liberam citocinas que ampliam a resposta imunológica celular e são principalmente pró-inflamatórias, enquanto que os linfócitos Th-2 liberam citocinas que ampliam a resposta humoral e são principalmente anti-inflamatórias (Goncharova et al., 2007).

A síntese de uma citocina é iniciada a partir da transcrição de um novo gene como resultado da ativação celular, sendo essa síntese transitória. As citocinas não são armazenadas como moléculas devido à ativação transcricional

ser também transitória e os RNAs mensageiros que codificam a maioria delas instáveis. A produção de citocinas pode ser controlada por processamento de RNA e por mecanismos pós-transcricionais. Após a síntese, as mesmas são rapidamente secretadas (Abbas e Lichtman, 2003), assim, a medição dessas se torna limitada devido à pequena meia-vida na circulação (Widner et al., 2000).

As citocinas desempenham seu papel biológico por ligarem-se a receptores específicos localizados na membrana de células alvo, e, assim, como resposta, alteram a expressão genética das mesmas. Muitos tipos celulares expressam estes receptores e são suscetíveis à ação destas citocinas. Todos esses receptores possuem uma ou mais proteínas transmembranas, sendo que a porção extracelular é responsável pela ligação a citocina e a porção citoplasmática responsável por iniciar sinais intracelulares (Abbas e Lichtman, 2003).

Como agem em concentrações picomolares, a expressão das citocinas frente a um antígeno não ocorre de maneira específica, visto que se ligam a qualquer receptor aos quais possuem afinidade. Entretanto, o sistema imunológico apresenta especificidade frente a um determinado antígeno. Logo, existe a necessidade da regulação da expressão dos receptores, a qual é realizada por meio da interação entre a célula produtora de citocina com o antígeno. Assim, a ativação das citocinas está limitada a um linfócito ativado por um antígeno (Guimarães e Scroferneker, 2007). Outra maneira de regular a expressão dos receptores é por meio da concentração local de citocinas produzidas pela interação direta entre a célula produtora e a célula alvo (Kindt et al., 2007).

Sabe-se que o aumento das concentrações de Phe acarreta no aumento de marcadores da ativação imune e inflamação (Zoller et al., 2012). A literatura apresenta-se escassa quando relaciona níveis de citocinas e pacientes com Deficiência de PAH. Contudo, sabe-se que pacientes com Deficiência de PAH que não estão sob tratamento dietético rigoroso têm níveis elevados de uma citocina pró-inflamatória (TNF- α) (Schulpis et al., 2005). Outro estudo realizado por Solverson et al (2012), observa, em camundongos com Deficiência de PAH, a redução dos níveis de três citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL1- β e GM-CSF)

após diminuição dos níveis de Phe através de uma dieta com glicomacropéptido. Sabe-se que a suplementação com zinco tem sido mostrada em várias doenças por diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias com consequente redução do processo inflamatório (Prasad, 2009).

Também é conhecida a relação de algumas citocinas pró-inflamatórias como estimuladoras da síntese de BH4 em vários tipos celulares (Thony, 2006). Assim, na inflamação aguda, a biossíntese de vários neurotransmissores pode ser estimulada pela produção de BH4 induzida por citocinas (Figura 3) (Neurauter et al., 2008). Essa estimulação varia conforme a célula em questão e a enzima expressa, tomando como exemplo as citocinas TNF- α , IL1- β e IFN- γ conhecidas por aumentar a produção de BH4, sendo a última considerada a mais potente indutora (Shi et al., 2004). Com isso, é descrito abaixo a relação entre as três enzimas envolvidas na síntese do BH4 com as citocinas:

- GTPCHI: principal reguladora da síntese do BH4. Sua atividade pode ser regulada no momento de transcrição e pós-tradução através da interação da enzima com a proteína GFRP, esta a qual modula a atividade enzimática. A regulação em uma célula ou tecido pode ser feita através de citocinas pró-inflamatórias, as quais estimulam a expressão do gene da enzima GTPCHI e diminuem a expressão do mRNA da proteína GFRP em células humanas como linfócitos T, macrófagos, monócitos, fibroblastos, células endoteliais, células do músculo liso, entre outras. Em contrapartida, algumas citocinas anti-inflamatórias inibem a expressão da GTPCHI (Thony, 2006);
- PTPS: esta enzima tem seu mRNA constitutivamente expresso, porém a sua atividade ou a própria enzima não está sempre presente em organismos superiores. Além disto, após estimulação da enzima GTPCHI, esta tem a sua taxa transcricional limitada na síntese de BH4. Alguns experimentos evidenciaram que a atividade da enzima PTPS permanece inalterada quando certos tipos celulares são tratados com citocinas pró-inflamatórias, ao contrário da enzima GTPCHI (Thony, 2006).
- SR: em mamíferos, não há indicação que a biossíntese de BH4 seja controlada pela mesma, visto que se sabe pouco sobre a expressão desta

enzima. Apesar de estar presente em todos os tecidos, a atividade da enzima SR não parece afetada com o tratamento de citocinas (Thony, 2006).

Em relação aos níveis de Phe e citocinas, um recente estudo publicado por Bai et al (2014) mostra que a administração de 4-cloro-DL-fenilalanina (PCPA) ocasiona diminuição da expressão dos níveis de algumas citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e ICAM-1. O estudo foi conduzido em um modelo animal, em que a PCPA foi capaz de reverter a Hipertensão Arterial Pulmonar induzida por monocrotalina atenuando a inflamação encontrada nestes pacientes. Segundo os autores, a serotonina está intimamente relacionada com a inflamação, incluindo a ativação de macrófagos alveolares, desenvolvimento da manutenção da remodelação vascular, e a indução da adesão de mastócitos e liberação de citocinas. Assim, a PCPA fortemente inibe a síntese de 5-Hidroxitriptofano (5-HT), e, portanto, de serotonina, por meio da inibição da triptofano-hidroxilase 1 (Tph-1), principal enzima responsável pela síntese de 5-HT.

2.4.2 ESTRESSE OXIDATIVO

Na inflamação crônica, a produção de espécies reativas de oxigênio e consequente processo de estresse oxidativo acaba por reduzir a meia-vida do BH4 que como consequência ocasiona HPA e reduz a produção de neurotransmissores (figura 3) (Neurauter et al., 2008; Capuron et al., 2011). O processo de estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e as espécies reativas formadas nos tecidos (Halliwell e Gutteridge, 2007), com consequente perda de funções biológicas pelo excesso de produção de radicais livres. Esses mecanismos ocorrem geralmente em membranas celulares, citoplasma e nas mitocôndrias, sendo a última a principal fonte geradora de radicais livres. O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação dos radicais livres. Esses

sistemas são divididos em enzimáticos e não enzimáticos (endógeno ou de forma dietética) (Barbosa et al., 2010).

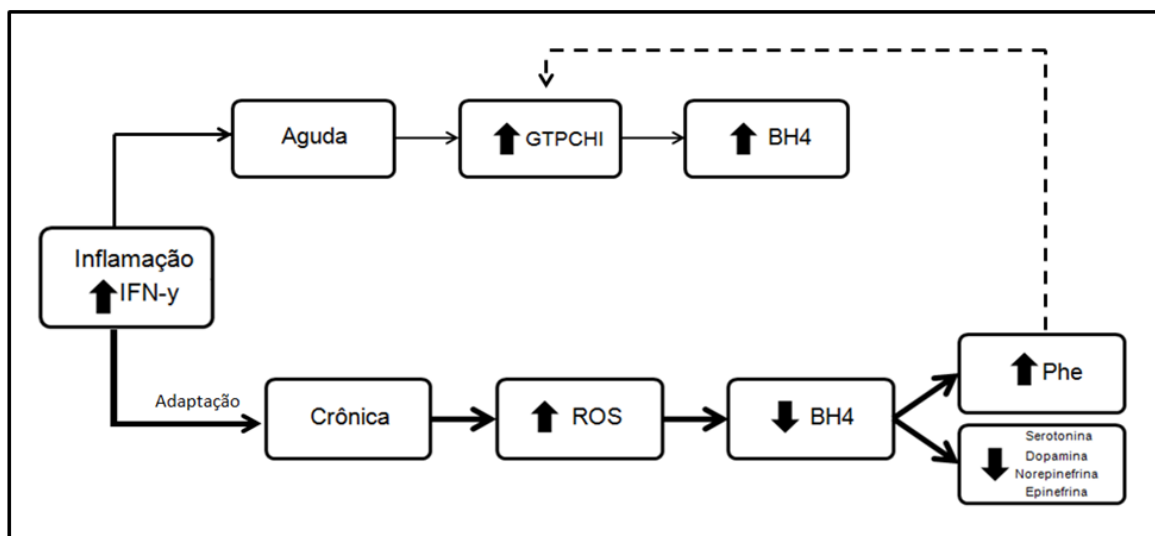


Figura 3 - Regulação dos níveis de BH4. Após inflamação aguda, estímulos pró-inflamatórios e até mesmo a fenilalanina (Phe) induzem a formação do nucleotídeo Guanosina Trifosfato, através do aumento da expressão da Guanosina Trifosfato Cicloidrolase (GTPCH), primeira das três enzimas envolvidas na síntese do BH4, aumentando consequentemente os níveis deste cofator. Já na inflamação crônica, estímulos pró-inflamatórios geram liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais produzem dano oxidativo. A oxidação do BH4 resulta na deficiência da atividade de enzimas dele dependente, como a fenilalanina hidroxilase (PAH), acarretando aumento dos níveis de Phe e diminuição da produção de neurotransmissores. Adaptado de Neurauter et al., 2008; Capuron et al., 2011.

As células geram energia por meio da redução de oxigênio molecular à água. Durante esse processo, pequenas quantidades de formas parcialmente reduzidas de oxigênio reativo são produzidas como subproduto da respiração mitocondrial. Algumas dessas formas são os radicais livres que podem causar lesão celular por serem quimicamente reativos. Um desequilíbrio entre a formação de radicais livres e o sistema de defesa resulta em estresse oxidativo, condição essa que tem sido associada com lesão celular em várias condições patológicas. É importante ressaltar que três reações são particularmente relevantes para a lesão celular, sendo elas a peroxidação lipídica das membranas, a modificação oxidativa de proteínas e dano oxidativo ao DNA (Wakamatsu et al., 2008).

O sistema de defesa enzimático inclui enzimas como Superóxido Dismutase, Catalase e Glutathiona Peroxidase. Essas enzimas agem por meio de

mecanismos de prevenção impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e conseqüentemente ocorrência de danos oxidativos. Já o sistema de defesa não enzimático inclui especialmente os compostos antioxidantes de origem dietética: vitaminas, minerais e compostos fenólicos (Barbosa et al., 2010). Os efeitos do estresse oxidativo dependem do tamanho da lesão, sendo a célula capaz de recuperar o seu estado original. Contudo, o estresse oxidativo mais grave ou até mesmo a forma moderada pode causar morte celular (Wakamatsu et al., 2008).

O processo de estresse oxidativo tem sido relatado em inúmeras doenças. A relação entre estresse oxidativo, erros inatos do metabolismo e acidemias orgânicas tem sido bastante evidenciada. Wajner et al (2004) mostra que vários ácidos orgânicos são capazes de induzir a produção de radicais livres e diminuir as defesas antioxidantes. Assim, novas perspectivas terapêuticas podem incluir o uso de antioxidantes apropriados juntamente com o tratamento de base.

A razão para o aumento de estresse oxidativo nestas doenças não está completamente esclarecida. Acredita-se que esse processo ocorra devido ao acúmulo de metabólitos tóxicos que levam à produção excessiva de radicais livres. Também, o aumento dos produtos metabólicos esgotam a capacidade antioxidante das células (Artuch et al., 2004). Em relação à Deficiência de PAH, além dos altos níveis de Phe, vários outros fatores devem ser considerados: como a deficiência na biossíntese de neurotransmissores (Hanley et al., 2000), a redução da biossíntese de mielina (Bauman e Kemper, 1982) e a deficiência de selênio pelo uso de fórmulas metabólicas que substituem uma dieta rica em proteínas naturais (Van Backel et al., 2000).

O processo de dano oxidativo em pacientes com Deficiência de PAH é bem relatado visto que alguns estudos mostram o aumento dos níveis do marcador tiobarbitúrico nestes pacientes, o qual indica o estímulo de lipoperoxidação, assim como a diminuição de reatividade antioxidante total refletindo em uma deficiente capacidade rápida de lidar com um aumento de espécies reativas (Sirtori et al., 2005; Sitta et al., 2006). Recentemente, foi sugerido que a administração de antioxidantes apropriados em pacientes com Deficiência de PAH em tratamento

dietético poderia auxiliar a prevenir danos que podem existir a despeito do tratamento (Ribas et al., 2011).

3 JUSTIFICATIVA

O Ambulatório de Tratamento de Distúrbios Metabólicos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre iniciou suas atividades em 1982 e, desde então, presta assistência a pacientes com Deficiência de PTPS e Deficiência de PAH. Diferentes estudos são realizados pelo grupo sobre essas doenças, sendo que, em 2011, Nalin et al buscaram identificar os pacientes com Deficiência de PAH responsivos à administração de BH4. Embora os estudos sobre o tratamento a longo prazo com BH4 ainda sejam escassos, estes indicam que esta terapia associa-se a fatores positivos com a redução dos níveis de Phe circulantes e consequente maior possibilidade de ingestão de alimentos ricos em Phe (Trefz e Blau, 2003; Fiege et al., 2005; Burlina e Blau, 2009).

Diversos estudos sugerem a existência de relação entre algumas citocinas e o aumento da síntese de BH4 por meio da estimulação da expressão dos genes que codificam as enzimas envolvidas na síntese do BH4 (Nichol et al., 1985; Schoedon et al., 1993; Rosenkranz-Weiss et al., 1994; Katusic et al., 1998; Walter et al., 1998; Thony et al., 2000; Thony, 2006; Ionova et al., 2008). Na Deficiência de PAH, apesar de existirem poucos estudos, esses sugerem a existência de inflamação, uma vez que os pacientes apresentam níveis de citocinas aumentados (Schulpis et al., 2005), porém não existem dados disponíveis na literatura relacionando citocinas e pacientes com Deficiência de BH4.

Assim sendo, a seguinte questão de pesquisa foi formulada: Qual é a relação existente entre os níveis de citocinas e marcadores de estresse oxidativo em pacientes com Deficiência de PAH submetidos ao teste de responsividade ao BH4 e em pacientes com Deficiência de PTPS? A nossa hipótese é a de que tais doenças associam-se ao estado inflamatório e, portanto, a aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e de marcadores de estresse oxidativo, os quais apresentam, nos pacientes com Deficiência de PAH, piora após sobrecarga aguda de L-Phe e redução após a ingestão de BH4.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

- Avaliar a relação entre fenilalanina, citocinas, BH4 e marcadores de estresse oxidativo em pacientes com Deficiência de PAH e Deficiência de PTPS.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar os níveis de citocinas e marcadores de estresse oxidativo em pacientes com Deficiência de PAH e compará-los com controles;

- Relacionar os níveis séricos basais de citocinas e marcadores de estresse oxidativo à responsividade ao BH4 apresentada pelos pacientes com Deficiência de PAH;

- Avaliar os níveis de citocinas e marcadores de estresse oxidativo associados à sobrecarga de L-Phe em pacientes com Deficiência de PAH;

- Avaliar os níveis de citocinas e marcadores de estresse oxidativo associados à sobrecarga de L-Phe+BH4 em pacientes com Deficiência de PAH;

- Relacionar os níveis séricos basais de citocinas e marcadores de estresse oxidativo com o tipo de Deficiência de PAH dos pacientes;

- Verificar os níveis de citocinas e de marcadores de estresse oxidativo em pacientes com Deficiência de PTPS e compará-los com controles;

- Avaliar a correlação existente entre os níveis de Phe e os níveis de citocinas nos pacientes com Deficiência de PAH e Deficiência de PTPS.

REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH (2003) Cellular and Molecular Immunology, 5ªed, pp: 243-247.

Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, de Paula SO, Minim VPR, Bressan J (2010) Estresse Oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. Nutr 23: 629-643.

Bernegger C, Blau N (2002) High frequency of tetrahydrobiopterin-responsiveness among hyperphenylalaninemias: a study of 1,919 patients observed from 1988 to 2002. Mol Genet and Metab, 77: 304 – 313.

Blau N (2006) Nomenclature and laboratory diagnosis of tetrahydrobiopterin deficiencies. In: Blau N. PKU and BH4: Advances in Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin., Heilbronn: SPS Verlagsgesellschaft, pp. 555-567.

Blau N, Belanger-Quintana A, Dermikol M, Feillet F, Giovannini M, MacDonald A, Trefz FK, van Spronsen FJ (2009a) Optimizing the use of sapropterin BH4 in the management of phenylketonuria. Mol Genet Metab 96: 158-163.

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

BLAU, N. et al (2009b) Management of phenylketonuria in Europe: Survey results from 19 countries. Molecular Genetics and Metabolism.

Bottiglieri T, Hyland K, Laudy M, Godfrey P, Carney MW, Toone BK, Reynolds EH (1992) Folate deficiency, biopterin and monoamine metabolism in depression. Psychol Med 22: 871-876.

BRASIL. Ministério da Saúde (2002) Manual de Normas Técnicas e Rotinas Operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal. Brasília, DF. PP 1-92.

Burlina A, Blau N (2009) Effect of BH4 supplementation on phenylalanine tolerance. *Journal of inherited metabolic disease*.32: 40-45.

Burnett JR (2007) Sapropterin dihydrochloride (Kuvan/ Phenoptin), an orally active synthetic form of BH4 for the treatment of phenylketonuria. *IDrugs*, 10: 805-13.

Capuron L, Schroecksnadel S, Féart A, Aubert A, Higuieret D, Barberger-Gateau P, Laye S, Fuchs D (2011) Chronic low grade inflammation in elderly persons is associated with altered tryptophan and tyrosine metabolism: role in neuropsychiatric symptoms. *Biol Psychiatry* 70: 175-182.

Casanova MMP e Muñoz MJG (2006) Hiperfenilalaninemias por déficit de cofator BH4. In: Sanjurjo P, Baldellou A. *Diagnóstico y Tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditárias*, pp.441-448.

Cunnington C, Channon KM (2010) Tetrahydrobiopterin: pleiotropic roles in cardiovascular pathophysiology. *Heart* 96: 1872-1877.

Curtius HC (2006) History of Tetrahydrobiopterin: From Butterfly Wings to Medicine. In: Blau N. *PKU and BH4: Advances in Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin*. Heilbronn: SPS Verlagsgesellschaft, pp. 453-502.

Curtius HC, Niederwiser A, Levine R, Langstrom B (1984) Therapeutic efficacy of tetrahydrobiopterin in Parkinson`s disease. *Adv Neurol* 40: 463-466.

Elsas LJ, Acosta PB (2003) Suporte Nutricional nas Doenças Metabólicas Hereditárias. In: Shils ME, et al., editores. *Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença*, São Paulo: Manole, pp: 1069 – 1127.

Fiege B, Bonafe L, Ballausen D, Baumgartner M, Thony B, Meieli D, Fiori L, Giovannini M, Blau N (2005) Extended tetrahydrobiopterin loading test in the diagnosis of cofactor-responsive phenylketonuria: a pilot study. *Molecular Genetics and Metabolism* 86:91-S95.

Giugliani R (1998) Erros inatos do metabolismo: uma visão panorâmica. *Pediatr Mod* 23: 29-39.

Goncharova LB, Tarakanov AO (2007) Molecular networks of brain and immunity. *Brain research reviews*, 55: 155-166.

Guimarães JB, Scroferneker ML (2007) Citocinas. In: Fischer GB, Scroferneker ML. *Imunologia Básica e Aplicada*, pp: 131-137.

Hennermann JB, Buhner C, Blau N, Vetter B, Monch E (2005) Long-term treatment with tetrahydrobiopterin increases phenylalanine tolerance in children with severe phenotype of phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*, 86: 86-90.

Hyland, K (2006) Tetrahydrobiopterin deficiencies with hyperphenylalaninemia. I In: BLAU, N.; PKU and BH4: *Advances in Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin*, p. 568 – 577.

Jardim LB, Giugliani R, Coelho JC, Dutra-Filho JC, Blau N (1994) Possible High Frequency of Tetrahydrobiopterin Deficiency in South Brazil. *J Inher Metab Dis* 17: 223-229.

Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA (2007) *Kuby Immunology*, 6^oed, pp: 302-326.

Lehninger AL (2004) *Principles of Biochemistry*, New York, pp: 656 – 689.

Longo, N (2009) Disorders of biopterin metabolism. *J. Inherited Metab Dis*, 32: 333-342.

Machado GA (2012) Desenvolvimento de um método de análise de pterinas em fluidos biológicos para diagnóstico diferencial de hiperfenilalaninemias. Rio de Janeiro. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

Matalon R, Koch R, Michals-Matalon K, Moseley K, Surendran S, Tyrin S, Erlanddsen H, Gamez A, Stevens RC, Romstad A, Moller LB, Gutler (2004) Biopterin responsive phenylketonuria hydroxylase deficiency. *Genetic in Medicine*, 6: 27-32.

Meininger CJ, Marinos RS, Hatakeyama K, Martinez-Zaquilan R, Rojas JD, Kelly KA, Wu G (2000) Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of

the spontaneously diabetic BB rat is due to tetrahydrobiopterin deficiency. *Biochem Journal* 349: 353-356.

Mitchell JJ, Scriver CR (2010) Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. [online] Disponível na Internet via WWW.URL:<http://www.geneclinics.org/servlet/access?db=geneclinics&site=gt&id=8888891&key=PFKG7IJBStkgL&gry=&fcn=y&fw=-Fi5&filename=/profiles/pku/index.html>

Muntau AC, Gersting SW (2006) Treatment of patients with tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Blau N. PKU and BH4: Advances in Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin, pp. 401 – 433.

Nalin T, Perry ID, Sitta A, Vargas CR, Saraiva-Pereira ML, Giugliani R, Blau N, Schwartz IVD (2011) Optimized loading test to evaluate responsiveness to tetrahydrobiopterin (BH4) in Brazilian patients with phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab* 104: 80-85.

Neurauter G, Schrocksnadel K, Scholl-Burgi S, Sperner-Unterweger B, Schubert C, Ledochowski M, Fuchs D (2008) Chronic Immune Stimulation Correlates with Reduced Phenylalanine Turnover. *Curr Drug Metab* 9: 622-627.

Nyhan W, et al (2005) Hyperphenylalaninemia and defective metabolism of tetrahydrobiopterin. In: *Atlas of Metabolic Diseases*, London, pp: 136 – 142.

Nyhan W, Ozand P (1998) Phenylketonuria. In: *Atlas of Metabolic Diseases*, London, pp: 109 – 116.

Opladen T, Hoffmann GF, Blau N (2012) An international survey of patients with tetrahydrobiopterin deficiencies presenting with hyperphenylalaninemia. *J Inherit Metab Dis* 35: 963-973.

Pampols T (2010) Inherited metabolic rare disease. *Adv Exp Med Biol* 686: 397-431.

Plana JC, et al (2006) Hiperfenilalaninemia. In: Sanjurjo P, Baldellou A. Diagnóstico y Tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias, pp.441-448.

Prasad AS (2009) Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. *Curr Opin Clin Nutr* 12: 646-652.

Remick DG (2003) Cytokines and cytokine receptors: Principles of action. In: Kronfol Z, editor. Cytokines and mental health.

Ribas GS, Sitta A, Wajner M, Vargas CR (2011) Oxidative Stress in Phenylketonuria: What is the Evidence? *Cell Mol Neurobiol* 31: 653-662.

Saudubray JM, Sedel F, Walter JH (2006) Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: an introduction. *J Inherit Metab Dis* 29: 261-274.

Schulpis KH, Papassotiriou I, Tsakiris S, Vounatsou M, Chrousos GP (2005) Increased plasma adiponectin concentrations in poorly controlled patients with phenylketonuria normalize with a strict diet: evidence for catecholamine-mediated adiponectin regulation and a complex effect of phenylketonuria diet on atherogenesis risk factors. *Metabolism Clinical and Experimental* 54: 1350-1355.

Scriver CR, Kaufman S (2001) Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, et al., editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, pp. 1667–1724.

Shi W, Meininger CJ, Haynes TE, Hatakeyama K, Wu G (2004) Regulation of tetrahydrobiopterin synthesis and bioavailability in endothelial cells. *Cell Biochem Biophys* 41: 415-434.

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

Sitta A, Barschak AG, Deon M, Terroso T, 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.

Smith I, Lee P (2000) The Hyperphenylalaninemias. In: Fernandes J, Saudubray M, Van Den Bergue G. *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*. Germany, pp. 171 – 184.

Soliz A, Chandler BD, Vasconcelos E (2007) The enigmatic baby: a practical approach to the diagnosis of inborn errors of metabolism. *International Pediatrics* 22: 192-196.

Solverson P, Murali SG, Brinkman AS, Nelson DW, Clayton MK, Yen CL, Ney DM (2012) Glycomacropeptide, a low-phenylalanine protein isolated from cheese whey, supports growth and attenuates metabolic stress in the murine model of phenylketonuria. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302: 885-895.

Sommer KC, Goldbeck AS, Wagner SC, Castro SM (2006) Triagem neonatal para hemoglobinopatias: experiência de um ano na rede de saúde pública no Rio Grande do Sul, Brasil. *Cad. Saúde Pública* 22: 1709-1714.

Tani Y, Fernell E, Watanabe Y, Kanai T, Langstrom B (1994) Decrease in 6R 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin content in cerebrospinal fluid of autistic patients. *Neurosci Lett* 181: 169-172.

Thony B (2006) Tetrahydrobiopterin and its functions. In: Blau N. *PKU and BH4: Advances in Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin.*, Heilbronn: SPS Verlagsgesellschaft, pp. 503-554.

Trefz FK, Blau N (2003) Potential role of tetrahydrobiopterin in the treatment of maternal phenylketonuria. *Pediatrics* 112: 1566 – 1569.

Wakamatsu TH, Dogru M, Tsubota K (2008) Tearful relations: oxidative stress, inflammation and eye diseases. *Arq Bras Oftamol* 71: 72-79.

Walter J H, Lee PJ, Burgard P (2006) Hyperphenylalaninaemia. In: Fernandes J. et al. *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*. Germany, pp. 222- 232.

Widner B, Ledochowski M, Fuchs D (2000) Interferon-gamma-induced tryptophan degradation: neuropsychiatric and immunological consequences. *Curr Drug Metab* 1: 193-204.

Zoller H, Schloegl A, Schroecksnadel S, Vogel M, Fuchs D (2012) Interferon-Alpha Therapy in Patients with Increases Plasma Phenylalanine and the Phenylalanine to Tyrosine Ratio. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 32: 216-220.

Zschocke J, Hoffmann G (2004) *Vademecum Metabolicum Manual of Metabolic Paediatrics*. Germany, 2^o Ed.

Zurfluh MR, Zschocke J, Lindner M, Feillet F, Chery C, Burlina A, Stevens RC, Thony B, Blau N (2008) Molecular genetics of tetrahydrobiopterin responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat* 29: 167-175.

O presente artigo será submetido à revista Journal of Inherited Metabolic Disease.

5 ARTIGO 1

CYTOKINE LEVELS AND OXIDATIVE STRESS MARKERS IN HYPERPHENYLALANINEMIA: TOWARD UNDERSTANDING THE ASSOCIATION BETWEEN PHENYLALANINE HYDROXILASE DEFICIENCY, PYRUVOYL TETRAHYDROPTERIN SYNTHASE DEFICIENCY AND INFLAMMATION

Tássia Tonon^{1,2,3}, Tatiéle Nalin^{1,2,3}, Angela Sitta², Patrícia Fernanda Schuck⁴,
Fernanda Sperb-Ludwig^{3,5}, Tamires Pavei Macan⁴, Roberta Hack Mendes^{1,3,6},
Filippo Vairo^{1,2,3}, Ida Vanessa Doederlein Schwartz^{1,2,3,5,7}

1 Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

2 Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

3 Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

4 Inborn Errors of Metabolism Laboratory, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Brazil.

5 Post-Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

6 Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil.

7 Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author:

Ida Vanessa Doederlein Schwartz
Serviço de Genética Médica
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos 2350
Porto Alegre, RS 90035-903
Brazil
Tel + 55 51 3359-8011
Email: ischwartz@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Phenylalanine hydroxylase (PAH) deficiency and pyruvoyl tetrahydropterin synthase (PTPS) deficiency are genetic diseases that cause hyperphenylalaninemia (HPA) and whose patients may benefit from tetrahydrobiopterin (BH4) administration. A better understanding of immune system involvement in these diseases is essential, as an inflammatory state appears to influence BH4 synthesis and oxidation. The objective was to assess levels of a cytokine panel in patients with PAH deficiency and PTPS deficiency, receiving dietary treatment and BH4/neurotransmitter supplementation respectively, and assess its association with clinical variables and oxidative stress parameters. Blood samples from patients with PAH deficiency were collected immediately before and 27 hours after administration of L-Phe, and 27 hours after combined oral administration of L-Phe and BH4. In patients with PTPS deficiency, blood samples were obtained before and after BH4 administration. Patients with PAH deficiency had elevated levels of 4 of the 6 pro-inflammatory cytokines tested, as well as increased glutathione levels, as compared with controls. There were no differences between BH4-responsive and nonresponsive patients in any of the assessed parameters, whether at baseline, after isolated L-Phe overload, or after combined L-Phe+BH4 overload. The patients with PTPS deficiency had no HPA and were no different from controls in terms of cytokine levels. This study suggests that PAH deficiency is associated with inflammation even in the setting of good metabolic control, unlike PTPS deficiency. Additional studies are required to confirm whether the differences between these two conditions are secondary to differences in Phe levels and/or to chronic BH4 therapy.

1. Introduction

Phenylalanine hydroxylase (PAH) deficiency, or phenylketonuria, is an inborn error of metabolism inherited in an autosomal recessive pattern and caused by the presence of mutations in the gene that codes for the enzyme phenylalanine hydroxylase (PAH; EC 1.14.16.1). PAH catalyzes the conversion of phenylalanine (Phe) into tyrosine through a reaction dependent on the cofactor tetrahydrobiopterin (BH₄), iron, and molecular oxygen (Scriver and Kaufman, 2001). If left untreated, patients with PAH deficiency develop elevated serum levels of Phe, which are toxic to the brain, and consequently cause progressive neurological impairment (Blau et al., 2010). Treatment consists of a Phe-restricted diet and supplementation of other amino acids and micronutrients by means of a specific metabolic formula (Plasencia et al., 2009). Approximately 55% of European patients with PAH deficiency exhibit a BH₄-responsive phenotype, in which exogenous administration of BH₄ leads to a reduction in circulating Phe levels (Zurfluh et al., 2008).

The term BH₄ deficiency is used to refer to a series of conditions resulting from deficient activity of any one of the enzymes involved in the synthesis or regeneration of BH₄, namely: guanosine triphosphate cyclohydrolase I (GTPCHI; EC 3.5.4.16); pyruvoyl tetrahydropterin synthase (PTPS; EC 4.6.1.10); sepiapterin reductase (SR; EC 1.1.1.153); pterin carbinolamine dehydratase (PCD; EC 4.2.1.96); and dihydropteridine reductase (DHPR; EC 1.6.99.7). PTPS deficiency accounts for 60% of all cases of BH₄ deficiency. In most patients, these deficiencies affect hepatic metabolism of PAH, resulting in hyperphenylalaninemia (HPA) and a reduction in the biosynthesis of norepinephrine, dopamine, and serotonin (Blau, 2006; Blau et al., 2001). Early treatment with BH₄ administration or a Phe-restricted diet, and L-dopa/carbidopa and 5-hydroxytryptophan supplementation, prevents progressive neurological dysfunction and usually keeps Phe levels within the reference range (Longo, 2009; Blau and Burgard, 2006).

Understanding the role of the immune system in PAH and PTPS deficiencies is essential, as expression of the enzymes involved in regulation of BH₄ synthesis is controlled by various substances, including cytokines (Werner et

al., 1998) and Phe itself (Yoneyama and Hatakeyama 1998) (Figure 1). It has been reported that some cytokines, such as IFN- γ , are strong inducers of reactive oxygen species (ROS) release, thus generating oxidative damage and reducing the half-life of BH4 (Figure 1) (Wirleitner et al., 2003). For instance, increases in serum Phe concentration associated with inflammation and consequent reductions in BH4 concentrations have been reported in HIV-1 infection, trauma, sepsis, and depression (Neurauter et al., 2008; Ploder et al., 2008; Zoller et al., 2012).

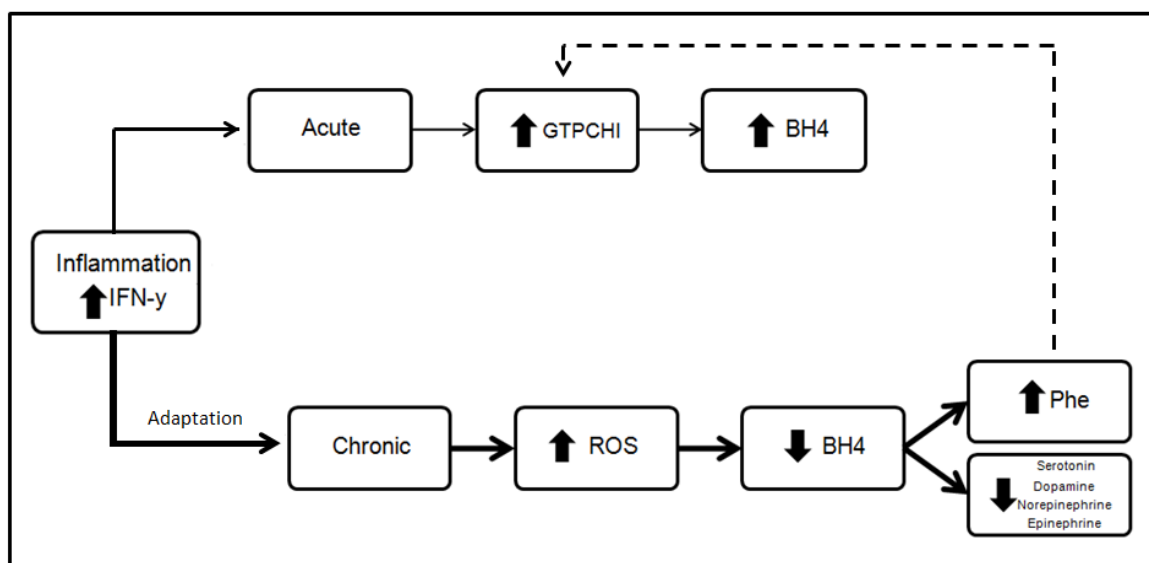


Figure 1- Regulation of tetrahydrobiopterin (BH4) levels. After acute inflammation, pro-inflammatory stimuli and even phenylalanine (Phe) itself induce formation of the nucleotide guanosine triphosphate by increasing expression of guanosine triphosphate cyclohydrolase (GTPCH), the first of three enzymes involved in the synthesis of BH4, and consequently increase levels of this cofactor. In chronic inflammation, pro-inflammatory stimuli lead to release of reactive oxygen species (ROS), which produce oxidative damage. Oxidation of BH4 leads to deficient activity of BH4-dependent enzymes, such as phenylalanine hydroxylase (PAH), thus increasing Phe levels and decreasing neurotransmitter production. Adapted from Neurauter et al., 2008; Capuron et al., 2011.

The main objective of the present study was to assess cytokine profiles in a sample comprising Brazilian patients with PAH deficiency who had undergone BH4 responsiveness testing and patients with PTPS deficiency, as well as evaluate the relationship between cytokines with clinical and oxidative stress parameters. We tested the hypothesis that these deficiencies are associated with an inflammatory

state and, thus, with an increase in pro-inflammatory cytokine and oxidative stress marker levels, and that, in patients with PAH deficiency, these levels would worsen after acute L-Phe loading and improve after BH4 administration.

2 Methods

This study included samples from patients treated at the Metabolic Disorders Outpatient Clinic of the Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (ATDM-SGM/HCPA), Brazil, and was approved by the HCPA Research Ethics Committee. The upper limit of normal for Phe levels was set at 120 $\mu\text{mol/L}$. Patients with a mean Phe level ≤ 360 $\mu\text{mol/L}$ in the year preceding study inclusion were classified as having excellent metabolic control. PKU was defined as classical or mild (Nalin et al., 2010) depending on the Phe level at diagnosis (>1200 $\mu\text{mol/L}$ or ≤ 1200 $\mu\text{mol/L}$ respectively).

2.1 Sampling strategy

A convenience sampling strategy was employed. The sample comprised 19 patients (17 with PAH deficiency and 2 with PTPS deficiency) and 19 healthy, age- and sex-matched controls.

Of the patients with PAH deficiency (10 female), seven had classical PKU and 10 had mild PKU. The median age at inclusion was 12.0 years (interquartile range [IQR], 9.5-16.0; range, 6.0-30.0), and at treatment onset, 2.0 months (IQR, 1.0-3.5; range, 0.1-69.0). Among controls (10 female), the median age at inclusion was 12.5 years (IQR, 11.0-14.0; range, 7.0-24.0). Patient samples were collected at the time of BH4 responsiveness testing reported elsewhere by Nalin et al (2011). For inclusion in the study, patients were required to meet all of the following criteria: a) age ≥ 4 years; b) good treatment adherence, defined as a median plasma Phe level < 600 $\mu\text{mol/L}$ during the 12 months preceding the study; c) current dietary treatment and metabolic formula use; and d) no comorbidities known to affect cytokine levels. One of the patients originally assessed by Nalin et

al (2011) was excluded because the number of blood samples was insufficient for cytokine profile analysis.

The two patients with PTPS deficiency included in this sample have been previously reported in the literature (Jardim et al., 1994), and were receiving long-term BH4 supplementation (sapropterin dihydrochloride, KUVAN®), one at a dose of 4.0 mg/kg/day and the other at a dose of 7.0 mg/kg/day. Both patients (A and B) were male and aged 35 and 33 years respectively. Patient A was also receiving valproic acid (2000 mg/day), carbamazepine (1700 mg/day), 5-hydroxytryptophan (450 mg/day), and levodopa (250 mg/day) + carbidopa (25 mg/day). Patient B was receiving levodopa (250 mg/day) + carbidopa (25 mg/day) and 5-hydroxytryptophan (350 mg/day). Neither patient had any comorbidities known to affect cytokine levels.

2.2 Clinical History

Information on clinical and demographic parameters, such as sex and past Phe levels, were obtained by means of a chart review.

2.3 Study Flow

2.3.1 – Patients with PAH Deficiency

For the BH4 responsiveness test reported by Nalin et al (2011), patients with PAH deficiency were instructed to attend two visits at HCPA, one week apart, each lasting one day and a half. On the first day at HCPA, after an overnight fast, blood was collected for measurement of Phe, cytokines, and oxidative stress parameters (baseline sample, study time point Ia). Following blood collection, patients were administered 100mg/kg L-Phe being resumed soon after, their usual diet. A second round of blood sample collection was performed 27 hours after L-Phe loading, again for measurement of Phe, cytokines, and oxidative stress parameters (study time point IIa).

At the second visit (week 2), after an overnight fast, blood was collected for measurement of Phe levels alone. Following blood sampling, patients were again given 100mg/kg L-Phe by mouth. After 3 hours, patients were given a single oral

dose of BH4, 20mg/kg (sapropterin dihydrochloride, KUVAN®) (Merck Serono, São Paulo, Brazil). A second round of blood sample collection was performed 27 hours after L-Phe loading (24 hours after BH4 loading) for measurement of Phe, cytokines, and oxidative stress parameters (study time point IIIa) (Figure 2).

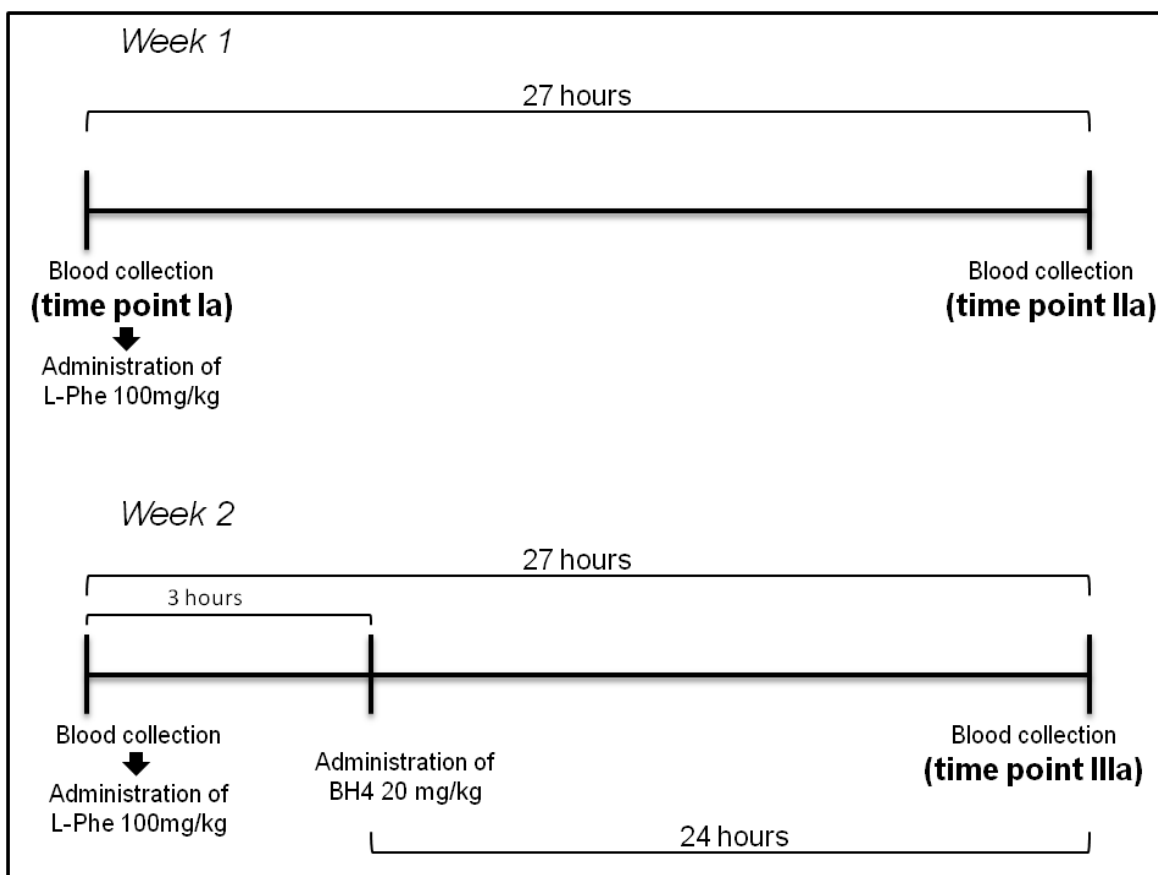


Figure 2: Study flow. Patients with PAH deficiency were instructed to attend two study visits at HCPA, one week apart, each visit lasting one day and a half. The time points of blood collection were: at baseline (time point Ia); 27 hours after L-Phe loading (time point IIa); and 24 hours after combined administration of L-Phe and BH4 (time point IIIa).

Phe levels were measured by tandem mass spectrometry (MS/MS), as described by Nalin et al (2011). BH4 responsiveness was defined as a $\geq 30\%$ reduction in plasma Phe levels 8 and/or 24 hours after combined L-Phe+BH4 loading as compared with the prior test, which consisted of L-Phe administration alone; of the 17 patients included, six were responsive and 11 were nonresponsive (Nalin et al., 2011).

2.3.2 – Patients with PTPS Deficiency

Plasma samples were collected from patients with PTPS deficiency, for measurement of Phe, cytokines, and oxidative stress parameters, at two time points: before the first BH4 dose of the day, after a 2-hour fast (time point Ib), and 4 hours after BH4 administration (time point IIb). Phe levels were measured by high-performance liquid chromatography (HPLC).

2.3.3 – Controls

A single fasting blood sample was collected from control subjects for measurement of cytokine levels and oxidative stress parameters.

2.4 Measurement of cytokines and oxidative stress markers

All analyses were performed in blinded fashion, both to patient/control status and to time point of assessment.

Cytokine quantitation was performed with the Invitrogen™ Human Cytokine Magnetic 10-Plex Panel kit (Luminex®), which measures the pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-8, IL6, TNF- α , IFN- γ , and GM-CSF) and the anti-inflammatory cytokines (IL-2, IL-4, IL-5, and IL-10). All analyses were carried out in duplicate; when the Δ was <30%, the two measurements were averaged and the mean taken into account for analysis. Results with Δ >30% were disregarded and the patient excluded from that particular analysis. All samples were compared to those of sex- and age-matched healthy controls.

The oxidative stress parameters assessed were carbonyl and sulfhydryl content, superoxide dismutase (SOD) activity, and glutathione (GSH) levels, by spectrophotometry, as per Reznick and Packer (1994), Aksenov and Markesbery (2001), Bannister and Calabrese (1987), and Browne and Armstrong (1998) respectively. All measurements were carried out in duplicate, averaged, and the mean taken into account for analysis.

2.5 Statistical analysis

All statistical analyses were carried out in PASW Statistics 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Descriptive analysis was carried out by means of absolute and

relative frequencies. Continuous variables were expressed as mean (standard deviation) or median (interquartile range) as appropriate. The Mann–Whitney *U* test was used for comparison of independent groups, i.e., the different groups of patients with PAH deficiency and their controls. The Friedman test was used to compare related sample data. The significance level was set at 5%, adjusted for multiple comparisons by means of Bonferroni correction. For statistical purposes, measurements below the reference range limit and thus deemed non-detectable (ND) were assigned a value of zero.

3 Results

3.1 PAH deficiency

The median Phe level was 236.0 (140.2-407.1) $\mu\text{mol/L}$ in baseline samples from week 1 and 286.5 (179.0-518.5) $\mu\text{mol/L}$ in baseline samples from week 2 ($p=0.079$). However, only five patients had excellent metabolic control.

A comparison of cytokine levels and oxidative stress markers between patients and controls is shown in Table 1. Significant increases in four pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-8, IL-6, IL-1 β) and one oxidative stress measurement (GSH levels) were observed in the patient group. There were no differences between classical PKU and mild PKU patients in any of the parameters assessed at baseline (data not shown).

Table 2 shows the results for all analyzed parameters at each time point of assessment (Ia, IIa, IIIa). The only variable to display changes was the Phe level, which increased after isolated L-Phe loading or combined L-Phe + BH4 loading.

There were no statistically significant differences between BH4-responsive and nonresponsive patients at any of the time points of analysis (data not shown).

3.2 PTPS deficiency

Levels of Phe, cytokines and oxidative stress parameters are shown in Table 3. Oxidative stress parameters were analyzed only in Patient A, as there was not enough material from Patient B to permit testing.

4 Discussion

PAH deficiency is the most common inborn error of amino acid metabolism, with an incidence of approximately 1:10,000 newborns (NB). Patients who begin a Phe-restricted diet early in life do not develop mental retardation, which is the most characteristic clinical manifestation of the disease (Blau et al., 2010). PTPS deficiency, which accounts for 0.5% of all HPA cases (Blau et al., 2001), is less common, with an estimated incidence of 1:400,000 NB in Southern Brazil (Jardim et al., 1994). Mental retardation is the most significant manifestation of this condition as well if it is not diagnosed and treated in a timely manner (Blau, 2006).

The findings of the present study are consistent with the existing literature, which suggests that inflammation is a feature of PAH deficiency (Schulpis et al., 2005); however, as we used a more comprehensive cytokine panel, we found evidence of elevated IL-8 and IL-6 levels, which had never before been described in these patients. In another novel finding, our data suggest that inflammation markers are not elevated in patients with treated PTPS deficiency. It bears stressing that our sample of patients with PAH deficiency was composed of patients with good treatment adherence, although only approximately one in three had excellent metabolic control. In other words, the baseline Phe levels measured in this group were above the reference range for the normal population. Conversely, the Phe levels of our PTPS deficiency patients were within reference range.

Cytokines are a class of low-molecular-weight soluble proteins that are secreted by white blood cells and other cell types in response to a number of specific stimuli and play a role in communication among the various cells of the immune system (Kindt et al., 2007). There is a dearth of literature on cytokine levels in the setting of PAH deficiency. In our review, we found only two studies.

One, conducted by Solverson et al (2012) in an animal (mouse) model of PAH deficiency, found reductions in the levels of three pro-inflammatory cytokines (IFN- γ , IL1 β , and GM-CSF) after normalization of Phe levels by administration of a glycomacropeptide diet. The second, conducted by Schulpis et al (2005), assessed only one pro-inflammatory cytokine (TNF- α) and found it to be increased not only in 18 patients with PAH deficiency who had discontinued treatment (mean Phe, 719 \pm 155 μ mol/L), but also in 20 healthy controls (mean Phe, 90 \pm 90 μ mol/L) as compared with 18 patients who were following a strict diet (mean Phe, 195 \pm 105 μ mol/L). This study is partially consistent with our findings, as we detected increased levels of pro-inflammatory cytokines in patients with PAH deficiency as compared with controls; however, our patients were receiving treatment (mean Phe, 266.2 \pm 139.7 μ mol/L). Schulpis et al (2005) do not provide an explanation for the fact that controls had TNF- α levels similar to those of untreated patients with PKU.

In acute inflammation, the biosynthesis of several neurotransmitters may be stimulated by cytokine-induced BH4 production (Capuron et al., 2011). Chronic inflammation has the opposite effect, as oxidative stress ultimately shortens the half-life of BH4, leading to HPA and to a reduction in neurotransmitter levels (Neurauter et al., 2008; Capuron et al., 2011). Therefore, we suggest that, in PAH deficiency, chronically elevated Phe levels ultimately stimulate cytokine secretion and, consequently, drive oxidative stress and a decrease in the half-life of BH4, which would contribute to maintenance of HPA (despite dietary intervention) and decreased synthesis of BH4-dependent neurotransmitters (although to a lesser degree than in genetic deficiencies). This is supported by the fact that patients with PTPS deficiency who are on long-term BH4 supplementation exhibit neither HPA nor increased levels of pro-inflammatory cytokines. The absence of abnormal cytokine levels observed in the present study after acute L-Phe or L-Phe+BH4 overload, even in patients considered BH4-responsive, does not invalidate our hypothesis, as the duration of L-Phe and/or BH4 exposure may have been insufficient to normalize cytokine levels. Furthermore, the small sample may have been underpowered to detect significant changes. Another possible explanations are that cytokines may have been measured too long after L-Phe and/or BH4

exposure (27 and 24 hours thereafter), and, consequently, after peak serum levels had been reached (Oliveira et al., 2011) or due to a physiological adaptation in relation to Phe levels, not allowing any significant change after acute overload of L-Phe.

Despite the increase observed in cytokine levels, we did not find any evidence of oxidative stress in our patients. Oxidative stress is defined as an imbalance between antioxidant defenses and reactive species formed in tissue, with consequent loss of biological function due to excess free radical production (Wakamatsu et al., 2009). Continued, unrestrained production of reactive oxygen species leads to increased damage of structures and molecules such as lipids, proteins, carbohydrates, and DNA, and may even affect DNA replication (Halliwell and Gutteridge, 2007). Broadly speaking, the risk of oxidative stress in patients with PAH deficiency may be linked to two aspects: the restrictions of the PKU diet, which may alter antioxidant defenses; or the disease itself, with production of reactive species by abnormal metabolites (Rocha and Martins, 2012). Some authors suggest that, in patients with PAH deficiency, the oxidative stress process is due to a buildup of Phe (Sirtori et al., 2005; Sitta et al., 2009) or its metabolites, such as phenylpyruvate, phenylacetate, and phenyllactate, which trigger release of free radicals and other reactive species; phenylacetate is the most toxic of these compounds (Kaufman, 1989).

According to Okano and Kagasaka (2013), oxidative stress increases markedly in patients with PAH deficiency when Phe levels are above 700-800 $\mu\text{mol/L}$. In our sample, Phe levels did not reach such a high range even after L-Phe loading, which might explain the absence of significant alterations in carbonyl and sulfhydryl content, and SOD activity in our patients. Alternatively, this absence of changes might be attributable to the small sample size. The significant increase in levels of GSH, which is one of the main non-enzyme endogenous antioxidants (Halliwell and Gutteridge, 2007), is probably linked to the deficiency of antioxidants such as selenium that occurs in patients receiving dietary treatment for PAH deficiency (Sitta et al., 2011). This finding suggests an active role in an attempt by the body to detoxify reactive species and maintain homeostasis in the

face of oxidative stress in patients with HPA (Moares et al., 2014). Unfortunately, we did not measure selenium levels in our patients. We were unable to interpret our findings regarding oxidative stress markers in patients with PTPS deficiency, as these parameters were analyzed in only one patient with the condition.

Free radical production appears to be implicated in a wide range of human diseases. It bears stressing that the brain has few antioxidant defenses as compared with other tissues, which makes it more vulnerable to increased levels of reactive species (Moares et al., 2014). A recent study suggested that administration of appropriate antioxidants to patients with PAH deficiency undergoing dietary treatment might help prevent damage that occurs despite therapy (Ribas et al., 2011). Furthermore, it has been documented that, in several conditions, zinc supplementation decreases production of pro-inflammatory cytokines and consequently blunts the inflammatory process (Prasad, 2009).

Long-term BH4 administration is recommended in patients with PTPS deficiency and BH4-responsive forms of PAH deficiency, which are usually defined on the basis of a reduction (at least 20-30%) in Phe levels after acute BH4 loading, with the purpose of mitigating HPA and increasing tolerance to Phe intake (Zurfluh et al., 2008; Longo, 2009). The existing evidence suggests that BH4 crosses the blood-brain barrier only at very high doses (Kaufman et al., 1982), far exceeding those usually prescribed to patients with BH4 deficiencies. However, the use of this substance has been discussed in a variety of other settings, such as the prevention and treatment of cardiovascular disease, as administration of this cofactor improves endothelial function by promoting vasodilation through nitric oxide production catalyzed by nitric oxide synthase (NOS; EC 1.14.13.39), a BH4-dependent enzyme (Shi et al., 2004).

Our findings suggest that cytokines are quite sensitive as markers of the biological effect of HPA. Elevated levels of these molecules in the setting of PAH deficiency, even in patients with good metabolic control and no evidence of oxidative stress, may be due to chronically increased Phe levels, perhaps in combination with relative BH4 deficiency. We suggest that additional studies on

the effect of the chronic BH4 administration upon the cytokine concentrations presented by patients with PAH deficiency be conducted.

Acknowledgements

The authors thank the HCPA Statistical Advisory Service, the HCPA Research and Event Incentive Fund (FIPE), the staff at the Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) Inborn Errors of Metabolism Laboratory and the SGM-HCPA Metabolites Analysis Laboratory, and our colleague Fernanda Bittencourt for their assistance with this manuscript.

References

Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302: 141-145.

Bannister J, Calabrese L (1987) Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal* 32: 279-312.

Blau N (2006) Nomenclature and laboratory diagnosis of tetrahydrobiopterin deficiencies. In: Blau N. *PKU and BH4: Advances in Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin*. Heilbronn: SPS Verlagsgesellschaft, 555-567.

Blau N, Burgard P (2006) Disorders of Phenylalanine and Tetrahydrobiopterin Metabolism. In : Blau N, Hoffmann GF, Leonard J, et al., eds. *Physician's Guide to the Treatment and Follow-up of Metabolic Diseases*. Berlin: Springer, 25-34.

Blau N, Thony B, Cotton RGH, et al (2001) Disorders of tetrahydrobiopterin and related biogenic amines. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al., eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 1725-1776.

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

Browne RW, Armstrong D (1998) Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* 108: 347-352.

Capuron L, Schroecksnadel S, Féart A, et al. (2011) Chronic low grade inflammation in elderly persons is associated with altered tryptophan and tyrosine metabolism: role in neuropsychiatric symptoms. *Biol Psychiatry* 70: 175-182.

Halliewell B, Gutteridge JMC (2007) Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death. In: Halliewell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press, 246-350.

Halliewell B, Gutteridge JMC (1996) Antioxidant defenses: glutathione metabolism. In: Halliewell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press, 164-161.

Jardim LB, Giugliani R, Coelho JC, et al. (1994) Possible High Frequency of Tetrahydrobiopterin Deficiency in South Brazil. *J Inher Metab Dis* 17: 223-229.

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

Kaufman S, Kapatos G, McInnes RR (1982) Use of tetrahydrobiopterin in the treatment of hyperphenilalaninemia due to defective synthesis of tetrahydrobiopterin: evidence that peripherally administered tetrahydrobiopterins enter the brain. *Pediatrics* 70:376-380.

Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA (2007) *Kuby Immunology*, 6th ed, pp: 302-326.

Longo, N (2009) Disorders of biopterin metabolism. *J Inherit Metab Dis* 32: 333-342.

Moares TB, Dalazen GR, Jacques CE, et al. (2014) Glutathione metabolism enzymes in brain and liver of hyperphenilalaninemic rats and the effect of lipoic acid treatment. *Metab Brain Dis* (Epub ahead of print).

Nalin T, Perry ID, Refosco LF, et al (2010) Fenilcetonúria no Sistema Único de Saúde: avaliação de adesão ao tratamento em um centro de atendimento do Rio Grande do Sul. *Rev HCPA* 30: 225-232.

Nalin T, Perry ID, Sitta A, et al. (2011) Optimized loading test to evaluate responsiveness to tetrahydrobiopterin (BH4) in Brazilian patients with phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab* 104: 80-85.

Neurauter G, Schrocksnadel K, Scholl-Burgi S, et al. (2008) Chronic Immune Stimulation Correlates with Reduced Phenylalanine Turnover. *Curr Drug Metab* 9: 622-627.

Okano Y, Nagasaka H (2013) Optimal serum phenylalanine for adult patients with phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 110: 424-430.

Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, et al. (2011) Citocinas e Dor. *Rev Bras Anesthesiol* 61: 255-265.

Plasencia LMM, Torres AJP, Tamayo LC (2009) Impacto social del tratamiento de la Fenilcetonuria em Cuba. Available from: <http://www.monografias.com/trabajos25/fenilcetonuria/fenilcetonuria.shtml>

Ploder M, Neurauter G, Spittler A, et al. (2008) Serum phenylalanine in patients post trauma and with sepsis correlate to neopterin concentrations. *Amino Acids* 35: 303-307.

Prasad AS (2009) Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. *Curr Opin Clin Nutr* 12: 646-652.

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

Ribas GS, Sitta A, Wajner M, et al. (2011) Oxidative Stress in Phenylketonuria: What is the Evidence? *Cell Mol Neurobiol* 31: 653-662.

Rocha JC, Martins MJ (2012) Oxidative stress in Phenylketonuria: future directions. *J Inherit Metab Dis* 35: 381-398.

Schulpis KH, Papassotiriou I, Tsakiris S, et al. (2005) Increased plasma adiponectin concentrations in poorly controlled patients with phenylketonuria normalize with a strict diet: evidence for catecholamine-mediated adiponectin regulation and a complex effect of phenylketonuria diet on atherogenesis risk factors. *Metab Clin Exp* 54: 1350-1355.

Scriver CR, Kaufman S (2001) Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, et al., editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 1667–1724.

Shi W, Meininger CJ, Haynes TE, et al. (2004) Regulation of tetrahydrobiopterin synthesis and bioavailability in endothelial cells. *Cell Biochem Biophys* 41: 415-434.

Sirtori LR, Dutra-Filho CS, Fitarelli D, et al. (2005) Oxidative stress in patients with phenylketonuria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1740: 68-73.

Sitta A, Barschak A, Deon M, et al. (2009) Effect of short and long term exposition to high phenylalanine blood level on oxidative damage in phenylketonuric patients. *Int J Devl Neuroscience* 27: 243-247.

Sitta A, Manfredini V, Biasi L, et al. (2009) Evidence that DNA damage is associated to phenylalanine blood levels in leukocytes from phenylketonuric patients. *Mutations Research* 679: 13-16.

Sitta A, Vanzin CS, Biancini GB, et al. (2011) Evidence that L-Carnitine and Selenium Supplementation Reduces Oxidative Stress in Phenylketonuric Patients. *Cell Mol Neurobiol* 31: 429-436.

Solverson P, Murali SG, Brinkman AS, et al. (2012) Glycomacropeptide, a low-phenylalanine protein isolated from cheese whey, supports growth and attenuates metabolic stress in the murine model of phenylketonuria. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302: 885-895.

Wakamatsu TH, Dogru M, Tsubota K (2009) Tearful relations: oxidative stress, inflammation and eye disease. *Arq Bras Oftamol* 71: 72-79.

Werner ER, Werner-Felmayer G, Mayer B (1998) Tetrahydrobiopterin, cytokines, and nitric oxide synthesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 280: 171-182.

Wirleitner B, Neurauder G, Schocksadel K, et al. (2003) Interferon-gamma-induced conversion of tryptophan: immunologic and neuropsychiatric aspects. *Curr Med Chem* 10: 1581-1591.

Yoneyama T, Hatakeyama K (1998) Decameric GTP cyclohydrolyase I forms complexes with two pentameric GTPCHI feedback regulatory proteins in the presence of phenylalanine or of a combination of tetrahydrobiopterin and GTP. *Biol Chem* 273: 20102-20108.

Zoller H, Schloegl A, Schroecksnadel S, et al. (2012) Interferon-Alpha Therapy in Patients with Increased Plasma Phenylalanine and the Phenylalanine to Tyrosine Ratio. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 32: 216-220.

Zurfluh MR, Zschocke J, Lindner M, et al. (2008) Molecular genetics of tetrahydrobiopterin responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat* 29: 167-175.

Table 1. Cytokine levels and oxidative stress markers at baseline (time point Ia) in patients with phenylalanine hydroxylase deficiency vs. controls

Parameter	Phenylalanine hydroxylase deficiency				Controls		p*
	n	Median (IQR)	Mean (SD)	N	Median (IQR)	Mean (SD)	
IL-1 β	12	18.6 (3.0-106.5)	130.8 (327.3)	12	0.0 (0.0-0.0)	2.2 (7.7)	0.001**
IL-6	13	1.1 (0.0-6.2)	3.4 (4.3)	13	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0)	0.001**
IL-8	17	15.2 (5.3-19.8)	13.7 (9.1)	17	0.0 (0.0-0.0)	6.3 (2.2)	0.001**
TNF- α	16	5.3 (4.7-6.7)	7.7 (9.6)	16	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0)	<0.001**
IFN- γ	16	0.0 (0.0-0.0)	1.1 (3.2)	16	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0)	0.363
GM-CSF	17	0.0 (0.0-0.0)	0.6 (2.6)	17	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0)	0.786
IL-2	17	0.0 (0.0-0.0)	11.0 (38.5)	17	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0)	0.394
IL-4	17	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0)	17	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0)	1
IL-5	17	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0)	17	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0)	1
IL-10	17	13.2 (0-15.0)	9.0 (9.8)	17	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0)	0.008
Carbonyl	9	0.2 (0.09-0.3)	0.2 (0.1)	9	0.3 (0.1-0.4)	0.3 (0.2)	0.237
Sulfhydryl	11	3.3 (1.9-5.0)	3.3 (1.7)	11	2.5 (1.6-3.4)	2.5 (1.4)	0.462
SOD	9	0.0 (0.0-0.1)	0.1 (0.0)	9	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0)	0.009
GSH	16	2.0 (1.9-3.1)	2.4 (0.8)	16	1.8 (1.8-1.9)	1.8 (0.1)	<0.001**

*p: Mann-Whitney *U* test. **Only these comparisons remained significant after Bonferroni correction. IQR, interquartile range. SD, standard deviation. Units of measurement: IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5, and IL-10, pg/mL; carbonyl, nmol/mg; sulfhydryl, nmol/mg; SOD, U/mg; GSH, nmol/mg.

Table 2. Comparison of plasma levels of phenylalanine (Phe), cytokines, and oxidative stress markers in patients with phenylalanine hydroxylase deficiency at time points Ia (baseline), IIa (after oral loading with 100 mg/kg L-Phe), and IIIa (after oral loading with 100 mg/kg L-Phe and 20 mg/kg BH4)

Parameter	n	Time point Ia		Time point IIa		Time point IIIa		p*
		Median (IQR)	Mean (SD)	Median (IQR)	Mean (SD)	Median (IQR)	Mean (SD)	
Phe	17	236.0 (140.2-407.1)	266.2 (139.7)	569.3 (314.6-713.9)	528.1 (249.8)	419.8 (199-695.7)	493.0 (344.8)	<0.001**
IL-1 β	9	13.7 (1.5-154.5)	167.9 (375.6)	9.8 (0.0-82.8)	144.1 (359.0)	5.84 (0.0-120.86)	117.25 (263.7)	0.104
IL-6	9	0.9 (0.0-6.1)	3.0 (4.9)	0.2 (0.0-4.2)	2.1 (3.5)	1.10 (0.0-7.25)	3.82 (5.88)	0.170
IL-8	16	15.6 (10.8-20.1)	14.5 (8.7)	13.6 (0-17.0)	10.6 (9.1)	16.63 (0-21.14)	13.56 (10.14)	0.005
TNF- α	16	5.4 (4.8-6.7)	8.1 (9.4)	5.2 (4.8-6.4)	6.9 (6.1)	5.54 (4.70-7.53)	9.08 (11.59)	0.687
IFN- γ	15	0.0 (0.0-0.0)	1.2 (3.3)	0.0 (0.0-0.0)	1.0 (3.8)	0.0 (0.0-0.0)	0.51 (1.98)	0.202
GM-CSF	16	0.0 (0.0-0.0)	0.7 (2.7)	0.0 (0.0-0.0)	0.6 (2.5)	0.0 (0.0-0.0)	1.31 (3.70)	0.156
IL-2	14	0.0 (0.0-0.0)	11.4 (42.5)	0.0 (0.0-0.0)	10.3 (38.6)	0.0 (0.0-0.0)	7.62 (28.52)	0.368
IL-4	16	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0-0.0)	1.60 (6.42)	0.368
IL-5	16	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0)	1.000
IL-10	16	13.2 (0-15.2)	9.6 (9.8)	6.5 (0-13.5)	7.2 (7.5)	13.15 (0-14.45)	8.76 (8.33)	0.395
Carbonyl	6	0.1 (0.0-0.4)	0.2 (0.2)	0.2 (0.1-0.3)	0.2 (0.1)	0.30 (0.10-0.41)	0.27 (0.17)	0.311
Sulfhydryl	11	3.3 (1.8-4.8)	3.0 (1.7)	1.9 (1.7-2.3)	2.0 (1.0)	2.75 (2.12-3.45)	3.24 (2.05)	0.052
SOD	14	0.0 (0.0-0.1)	0.6 (0.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0)	0.03 (0.01-0.05)	0.04 (0.04)	0.751
GSH	15	2.3 (1.9-3.3)	2.6 (0.7)	2.0 (1.8-3.0)	2.29 (0.56)	2.07 (1.85-2.98)	2.38 (0.66)	0.085

*p: Friedman test. **Only this comparison remained significant after Bonferroni correction. Phe levels were significantly increased at time points IIa and IIIa vs. time point Ia. IQR, interquartile range. SD, standard deviation. Units of measurement: phenylalanine (Phe), $\mu\text{mol/L}$; IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5, and IL-10, pg/mL ; carbonyl, nmol/mg ; sulfhydryl, nmol/mg ; SOD, U/mg ; GSH, nmol/mg .

Table 3. Levels of phenylalanine (Phe), cytokines, and oxidative stress markers in patients with pyruvoyl tetrahydropterin synthase deficiency before the first BH4 dose of the day, and 4 hours after BH4 administration

	Phe ($\mu\text{mol/L}$)	Cytokines (pg/mL)	Sulfhydryl (nmol/\squareG)	Carbonyl (nmol/\squareG)	SOD (U/\squareG)	GSH (nmol/\squareG)
Patient 1 – Pre BH4	60.5	ND	1.079	0.248	0.024	1.841
Patient 1 – Post BH4	51.4	ND	1.647	0.036	0.043	1.981
Control Patient 1	-	ND	1.170	-	0.025	1.810
Patient 2 – Pre BH4	74.3	ND	-	-	-	-
Patient 2 – Post BH4	113.1	ND	-	-	-	-
Control Patient 2	-	ND	-	-	-	-

-: not performed.

The cytokines tested were undetectable in these patients, as in controls (ND: not detected). Oxidative stress parameters were analyzed only in Patient A, as there was not enough blood sample from Patient B to permit testing. The matched control for patient 1 had enough blood sample only for measurement of sulfhydryl content, GSH levels, and SOD activity.

O presente artigo será submetido à revista International Journal of Molecular Medicine

6 Artigo 2

Serum phenylalanine concentration in humans is inversely correlated with cytokine concentration

Tássia Tonon^{1,2,3}

tassia.tonon@hotmail.com

Filippo Vairo^{1,2,3}

filippo_vairo@yahoo.com.br

Fernanda Sperb-Ludwig^{3,4}

fesperb@ig.com.br

Ida Vanessa Doederlein Schwartz^{1,2,3,4,5}

idadschwartz@gmail.com

1 Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

2 Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

3 BRAIN (Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences) Laboratory, Porto Alegre, Brazil.

4 Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

5 Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence to:

Ida Vanessa Doederlein Schwartz
Serviço de Genética Médica
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos 2350
90035-903 – Porto Alegre – RS – Brasil
Phone + 55 51 3359-8011
Email: idadschwartz@gmail.com

To the editor:

We have read with great interest the article published by Bai et al (1) about the reversal of monocrotaline (MCT)-induced pulmonary arterial hypertension (PAH) in rats by administering 4-chloro-DL-phenylalanine (PCPA). MCT increased right ventricular hypertrophy index, lung inflammation, and mortality, outcomes that could be associated with increased levels of proinflammatory cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). Conversely, administering PCPA to the animal model attenuated PAH and reduced the expression of these cytokines. According to the authors, in addition to being recognized as one of the most important growth factors in PAH, serotonin is closely related to inflammation, including the activation of alveolar macrophages, the maintenance of vascular remodeling, the induction of mast cell adhesion, and the release of cytokines. PCPA strongly inhibits the synthesis of 5-hydroxytryptophan (5-HTP) and therefore of serotonin by inhibiting tryptophan hydroxylase 1 (EC 1.14.16.4; Tph-1), the enzyme responsible for the peripheral synthesis of 5-HT. A similar study demonstrated that the inhibition of 5-HT synthesis by PCPA not only attenuates the severity of inflammation associated with dextran sulfate sodium-induced colitis but also reduced the production of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the gut (2). Interestingly, PCPA was also used in the past to generate animals models with phenylalanine hydroxylase deficiency (PAH deficiency, phenylketonuria, or PKU), since it also inhibits phenylalanine hydroxylase enzyme (EC 1.14.16.1; PAH) (3).

Our group focuses on studying monogenic human diseases associated with increased serum concentrations of phenylalanine (Phe), such as PKU and pyruvoyl tetrahydropterin synthase deficiency (EC 4.6.1.10; PTPS). With regard to PKU, treatments usually implemented for patients include a Phe-restricted diet and supplementation of essential amino acids. Untreated patients usually have high Phe levels and consequently mental retardation (4). In cases of PTPS deficiency (5), there is a deficit in the synthesis of tetrahydrobiopterin (BH₄), which is a cofactor of PAH enzyme and of other enzymes such as tyrosine hydroxylase (EC 1.14.16.3; TH), Tph-1, and nitric oxide synthase (EC 1.14.13.39; NOS) (6). These patients are treated with

supplementation of BH4 and of neurotransmitters or their precursors (L-dopa/carbidopa and 5-HT) (4). There are few studies demonstrating an increase in cytokine levels in PKU patients (7) and a decrease in its levels after implementation of therapy (8).

A recent study conducted by our group with two 33 and 35-year-old patients with PTPS deficiency and normal serum Phe concentration found that they did not show increased cytokine levels compared to controls, while 17 PKU patients with increased serum Phe concentration (13.24±6.16 years) showed high levels of proinflammatory cytokines (9). Serum cytokine and Phe concentrations of PKU patients were assessed at three time points (baseline, 27 hours after the administration of L-Phe, and 27 hours after the combined administration of L-Phe+BH4). Mean Phe levels (±standard deviation) for these three time points were 266.2±139.7 µmol/L, 528.1±249.8 µmol/L, and 493.0±344.8 µmol/L, respectively (reference value = up to 120 µmol/L). Patients with PTPS deficiency were evaluated at baseline, with mean Phe levels of 86.81±37.21 µmol/L, and 4 hours after the administration of BH4, with mean Phe levels of 62.86±16.17 µmol/L. Therefore, overall we analyzed 55 concomitant measures of Phe and cytokine levels to investigate the correlation between these measures (51 measures in PKU patients + 4 in patients with PTPS deficiency). Phe concentration in PKU patients was measured by tandem mass spectrometry and in patients with PTPS deficiency by high-performance liquid chromatography. Cytokine concentrations were determined using the Human Cytokine Magnetic 10-Plex Panel kit (Invitrogen™) for the Luminesx® platform, which provides the doses of proinflammatory cytokines (IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, interferon γ [IFN-γ], and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor [GM-CSF]) and anti-inflammatory (IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10) cytokines. Measures were taken in duplicate and mean values were calculated; when the variation was >30%, the individual was excluded from the analysis. Significant negative correlations were observed for IL-1β (rs= -0.351; p= 0.031; n= 38), IL-8 (rs= -0.324; p= 0.023; n= 49), and TNF-α (rs= -0.363; p= 0.01; n= 49). When patients with undetected values for these three cytokines were excluded from the analysis, only TNF-α remained statistically significant (rs= -0,414; p= 0,005 n= 44) (Figure 1). At baseline, no correlation was found between age and Phe levels (rs= -0.163; p= 0.505; n= 19) nor between age and IL-8

($r_s = -0.073$; $p = 0.765$; $n = 19$) and TNF- α ($r_s = -0.342$; $p = 0.152$; $n = 19$) levels. However, a significant negative correlation was observed between age and IL1- β levels ($r_s = -0.629$; $p = 0.016$; $n = 14$).

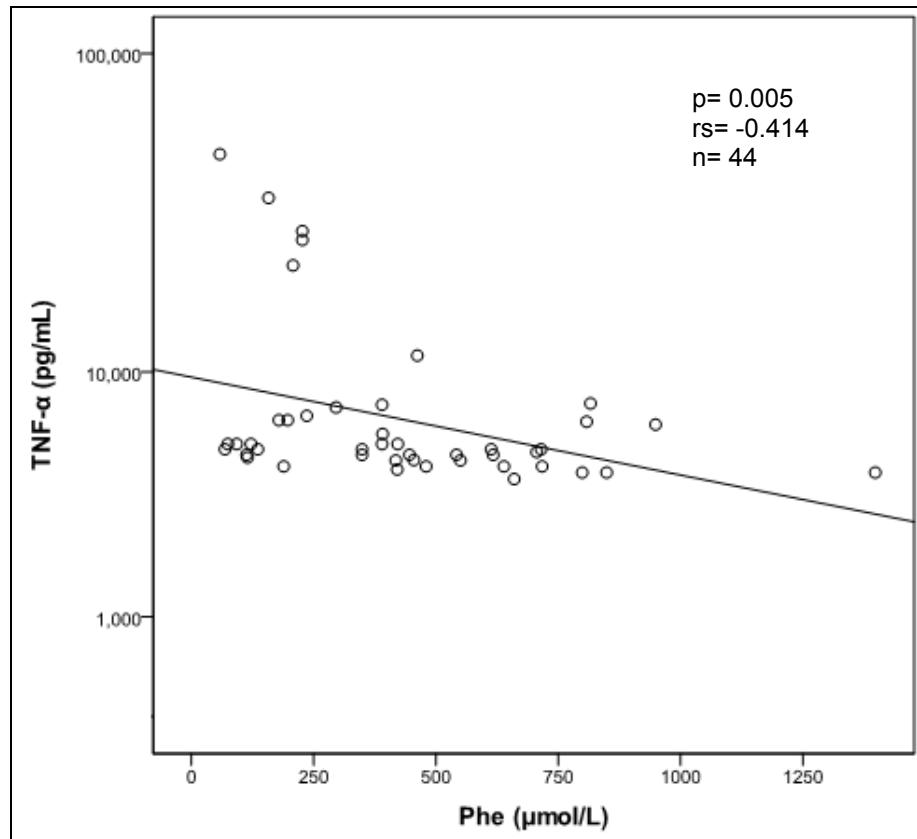


Figure 1. Correlation between Phe and TNF- α levels

It is known that immune system activity changes with age due to a decrease in the number of T lymphocytes, cells responsible for the production of cytokines, which would justify the negative correlation observed between age and IL1- β levels (10). In turn, the negative correlation found in this study between TNF- α and Phe is in agreement with the findings by Bai et al (1) recently published in this journal. As can be seen in Figure 2, Phe and PCPA are very similar and differ basically due to the presence of a chlorine molecule in PCPA. Thus, we suggest that Phe may also exert an inhibitory

effect on the Th1 enzyme, maybe depending on its concentration, by reducing the peripheral concentration of serotonin and of proinflammatory cytokines.

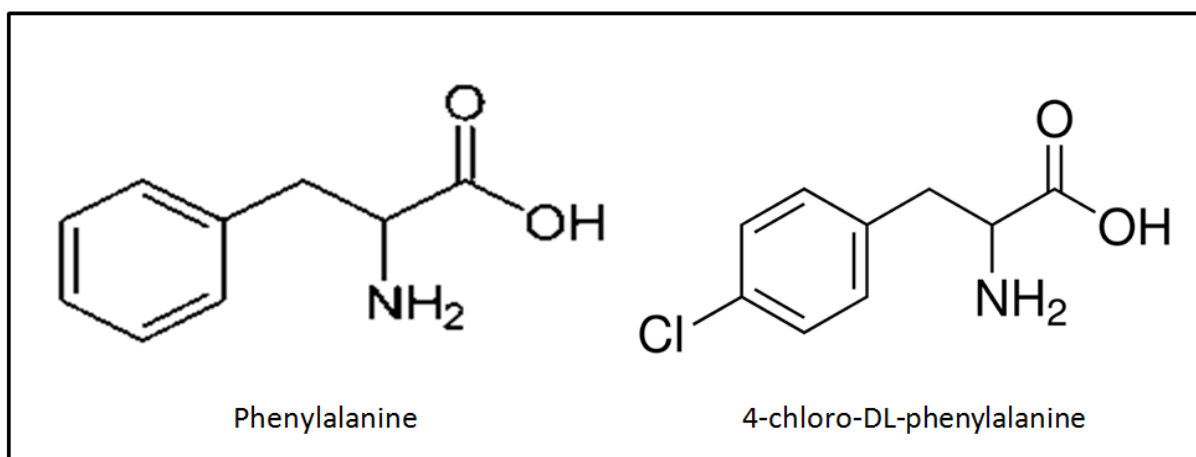


Figure 2. Chemical nomenclature of phenylalanine and chloro-phenylalanine.

Acknowledgements

The authors would like to thank Assessoria Estatística and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre for the services provided.

References

1. Bai Yang, Wang Han-Ming, Liu Ming, et al: 4-Chloro-DL-phenylalanine protects against monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling and lung inflammation. *Int J Mol Med* 33: 373-382, 2014.
2. Ghia JE, Li N, Wang H, et al: Serotonin has a key role in pathogenesis of experimental colitis. *Gastroenterology* 137: 1649-1660, 2009.
3. Schalock RL, Brown WJ, Copenhaver JH, et al: Model phenylketonuria (PKU) in the Albino Rat: Behavioral, biochemical, and neuroanatomical effects. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 89: 655-666, 1975.
4. Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL: Phenylketonuria. *The Lancet* 376: 1417-1427, 2010.

5. Longo, N: Disorders of biopterin metabolism. *J Inherit Metab Dis* 32: 333-342, 2009.
6. Thony B: Tetrahydrobiopterin and its functions. In: Blau N. *PKU and BH4: Advances in Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin.*, Heilbronn: SPS Verlagsgesellschaft, pp. 503-554, 2006.
7. Schulpis KH, Papassotiriou I, Tsakiris S, et al: Increased plasma adiponectin concentrations in poorly controlled patients with phenylketonuria normalize with a strict diet: evidence for catecholamine-mediated adiponectin regulation and a complex effect of phenylketonuria diet on atherogenesis risk factors. *Metabolism Clinical and Experimental* 54: 1350-1355, 2005.
8. Solverson P, Murali SG, Brinkman AS, et al: Glycomacropptide, a low-phenylalanine protein isolated from cheese whey, supports growth and attenuates metabolic stress in the murine model of phenylketonuria. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302: 885-895, 2012.
9. Tonon T. Estudo clínico sobre a relação entre fenilalanina, citocinas, tetraidrobiopterina e marcadores de estresse oxidativo usando como modelos a deficiência de fenilalanina hidroxilase e a deficiência de tetraidrobiopterina. Porto Alegre. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.
10. Gomez CR, Boehmer E, Kovacs EJ. The aging innate immune system. *Curr Opin Immunol* 17:457-462, 2005.

7 CONCLUSÕES

OBJETIVO GERAL: Avaliar a relação entre fenilalanina, citocinas, tetraidrobiopterina e marcadores de estresse oxidativo em pacientes com Deficiência de PAH e Deficiência de PTPS.

Após observarmos o aumento significativo de quatro citocinas pró-inflamatórias nos pacientes com Deficiência de PAH, o presente estudo sugeriu a existência de inflamação nestes grupos de pacientes. Esse mesmo resultado não foi encontrado para pacientes com Deficiência de PTPS.

Entretanto, apesar de termos encontrado aumento das concentrações de citocinas, não encontramos evidência de ocorrência de estresse oxidativo tanto nos pacientes com Deficiência de PAH como nos pacientes com Deficiência de PTPS.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS: Verificar os níveis de citocinas e marcadores de estresse oxidativo em pacientes com Deficiência de PAH e compará-los com controles.

Foi observado aumento significativo em 4/10 citocinas pró-inflamatórias analisadas (TNF- α , IL-8, IL-6 e IL-1 β) e de um marcador de defesa antioxidante (GSH) nos pacientes quando comparados com os controles.

Relacionar os níveis séricos basais de citocinas e marcadores de estresse oxidativo à responsividade ao BH4 apresentada pelos pacientes com Deficiência de PAH.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os pacientes responsivos ou não responsivos ao BH4 no período basal.

Avaliar os níveis de citocinas e marcadores de estresse oxidativo associados à sobrecarga de L-Phe em pacientes com Deficiência de PAH.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os pacientes após sobrecarga de L-Phe.

Avaliar os níveis de citocinas e marcadores de estresse oxidativo associados à sobrecarga de L-Phe+BH4 em pacientes com Deficiência de PAH.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os pacientes após sobrecarga de L-Phe+BH4.

Relacionar os níveis séricos basais de citocinas e marcadores de estresse oxidativo com o tipo de Deficiência de PAH dos pacientes.

Os pacientes com Deficiência de PAH Clássica e Leve não diferiram em relação aos parâmetros analisados na coleta basal.

Verificar os níveis de citocinas e de marcadores de estresse oxidativo em pacientes com Deficiência de PTPS e compará-los com controles.

As citocinas destes pacientes foram todas não detectáveis, não diferindo dos controles. Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo, foi somente possível analisar um paciente e seu controle, uma vez que não havia material suficiente para analisar estes parâmetros no segundo paciente, inviabilizando nossa análise.

Avaliar a correlação existente entre os níveis de Phe e os níveis de citocinas nos pacientes com Deficiência de PAH e Deficiência de PTPS.

Foram obtidas correlações negativas significativas para IL-1 β , IL-8 e TNF- α .

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Algumas considerações devem ser feitas em relação à escolha dos pontos (IIa e IIIa) analisados nos pacientes com Deficiência de PAH que foram submetidos ao teste de responsividade ao BH4 utilizado nesta dissertação. Acreditamos que a escolha destes, ponto IIa (27 horas após sobrecarga de L-Phe) e ponto IIIa (após 24 horas da sobrecarga combinada de L-Phe+BH4), foram tardios para a medição de citocinas, visto que após a sua síntese, as mesmas são rapidamente secretadas, dificultando e limitando a análise devido à pequena meia-vida na circulação. Outra consideração é a de que as amostras utilizadas para a realização desta dissertação já haviam sido coletadas, com exceção das amostras de pacientes com deficiência de PTPS, e encontravam-se armazenadas em freezer -80°C, fato este que pode, de alguma forma, ter limitado nossas análises.

Também, em relação às dificuldades encontradas na realização deste estudo, frisamos o número reduzido de pacientes, visto que estamos falando de duas doenças raras, principalmente nos pacientes com Deficiência de PTPS. O protocolo atualmente vigente para triagem neonatal da Deficiência de PAH não prevê a exclusão, por meio dos métodos específicos, do diagnóstico de deficiência de BH4. As deficiências de BH4 são, portanto, certamente subdiagnosticadas no Brasil.

Como perspectivas, planejamos analisar marcadores de estresse oxidativo em pacientes com Deficiência de PAH avaliados por Bioimpedância Elétrica e associar estes dados ao estado nutricional dos pacientes.

APÊNDICES

APÊNDICE I

Tabela 1- Comparação das concentrações plasmáticas de fenilalanina, citocinas e marcadores de estresse oxidativo apresentadas no período basal (ponto Ia) pelos pacientes com Deficiência de Fenilalanina Hidroxilase Responsivos e Não Responsivos ao BH4

Variáveis	N	Responsivo ao BH4 (n= 6)			Não Responsivo ao BH4 (n= 11)			p*
		Mediana (IQ)	Média (±DP)	n	Mediana (IQ)	Média (±DP)	n	
Phe	6	177,87 (108,9-278,3)	203,28 (±122,81)	11	348,48 (175,45-417,45)	307,94 (±140,36)	0,159	
IL-1β	4	8,36 (0,75-102,63)	37,25 (±63,62)	8	25,68 (3,72-139,88)	177,59 (±398,92)	0,448	
IL-6	4	1,19 (0,27-9,55)	3,67 (±5,78)	9	0,93 (0,0-6,52)	3,30 (±3,92)	0,544	
IL-8	6	19,06 (11,93-22,38)	16,72 (±8,70)	11	12,56 (0,0-18,74)	11,99 (±9,39)	0,192	
TNF-α	6	5,36 (3,43-6,02)	4,68 (±2,44)	11	5,42 (4,70-6,87)	9,20 (±11,33)	0,550	
IFN-γ	5	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (±0,0)	11	0,0 (0,0-1,64)	1,59 (±3,79)	0,189	
GM-CSF	6	0,0 (0,0-2,67)	1,78 (±4,36)	11	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (±0,0)	0,197	
IL-2	6	0,0 (0,0-1,74)	1,16 (±2,84)	11	0,0 (0,0-5,24)	16,38 (±47,79)	0,750	
IL-4	6	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (±0,0)	11	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (±0,0)	1,000	
IL-5	6	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (±0,0)	11	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (±0,0)	1,000	
IL-10	6	13,22 (0,0-16,04)	10,01 (±7,97)	11	0,0 (0,0-14,86)	8,53 (±10,98)	0,910	
Carbonilas	6	0,17 (0,09-0,59)	0,28 (±0,27)	8	0,14 (0,05-0,29)	0,16 (±0,11)	0,519	
Sulfidrilas	5	3,34 (1,82-4,59)	3,23 (±1,41)	9	3,36 (1,43-5,20)	3,31 (±1,83)	0,841	
SOD	5	0,04 (0,01-0,10)	0,05 (±0,05)	11	0,04 (0,02-0,11)	0,06 (±0,05)	0,777	
GSH	6	2,50 (1,91-3,21)	2,55 (±0,68)	11	2,02 (1,92-3,27)	2,44 (±0,85)	1,000	

p*: Teste de Mann-Whitney; Mediana (IQ: intervalo interquartis); Phe (fenilalanina) em μmol/L; IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10: (pg/mL); Carbonilas: (nmol/mg); Sulfidrilas: (nmol/mg); SOD: (U/mg); GSH: (nmol/mg).

APÊNDICE II

Tabela 2- Comparação das concentrações plasmáticas de fenilalanina, citocinas e marcadores de estresse oxidativo apresentadas no período após sobrecarga de L-Phe (ponto IIa), pelos pacientes com Deficiência de Fenilalanina Hidroxilase Responsivos e Não Responsivos ao BH4

Variáveis	Responsivo ao BH4 (n= 6)			Não Responsivo ao BH4 (n= 11)			p*
	N	Mediana (IQ)	Média (±DP)	n	Mediana (IQ)	Média (±DP)	
Phe		569,50 (130,25-874,00)	531,0 (349,37)		537,60 (366,50-708,75)	527,30 (191,64)	1,000
IL-1β	5	3,02 (1,51-54,36)	22,95 (42,59)	9	5,84 (2,92-44,48)	135,37 (361,17)	0,544
IL-6	6	0,48 (0,0-2,98)	1,56 (2,57)	8	0,10 (0,0-0,95)	1,43 (3,27)	0,638
IL-8	6	16,63 (10,36-17,92)	14,09 (7,21)	10	6,32 (0,0-15,33)	8,56 (9,75)	0,133
TNF-α	6	5,06 (3,34-5,72)	4,44 (2,29)	10	5,36 (5,06-8,53)	8,32 (7,32)	0,174
IFN-γ	6	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0)	10	0,0 (0,0-0,0)	4,48 (4,68)	0,439
GM-CSF	6	0,0 (0,0-2,50)	1,67 (4,09)	10	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0)	0,197
IL-2	5	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0)	9	0,0 (0,0-0,0)	16,07 (48,21)	0,456
IL-4	6	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0)	11	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0)	0,295
IL-5	6	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0)	10	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0)	1,000
IL-10	6	13,29 (0,0-15,59)	9,89 (7,83)	10	0,0 (0,0-13,49)	5,55 (7,18)	1,000
Carbonilas	5	0,17 (0,02-0,22)	0,13 (0,10)	7	0,29 (0,16-0,73)	0,44 (0,41)	0,088
Sulfidrilas	6	2,10 (1,74-2,37)	2,03 (0,42)	7	1,77 (0,84-4,41)	2,35 (1,94)	0,568
SOD	5	0,02 (0,01-0,03)	0,02 (0,01)	10	0,05 (0,02-0,12)	0,07 (0,07)	0,111
GSH	6	1,96 (1,76-3,00)	2,25 (0,61)	9	2,05 (1,88-2,96)	2,31 (0,56)	0,409

p*: Teste de Mann-Whitney; Mediana (IQ: intervalo interquartil); Phe (fenilalanina) em μmol/L; IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10: (pg/mL); Carbonilas: (nmol/mg); Sulfidrilas: (nmol/mg); SOD: (U/mg); GSH: (nmol/mg).

APÊNDICE III

Tabela 3- Comparação das concentrações plasmáticas de fenilalanina, citocinas e marcadores de estresse oxidativo apresentadas no período após sobrecarga de L-Phe+BH4 (ponto IIIa), pelos pacientes com Deficiência de Fenilalanina Hidroxilase Responsivos e Não Responsivos ao BH4

Variáveis	N	Responsivo ao BH4 (n= 6)			Não Responsivo ao BH4 (n= 11)			p*
		Mediana (IQ)	Média (±DP)	n	Mediana (IQ)	Média (±DP)	n	
Phe	6	272,0 (707-683,25)	355,37 (312,15)	11	482 (344,5-738,2)	575,37 (312,15)	0,159	
IL-1β	5	11,15 (0,0-146,7)	60,91 (90,82)	7	5,14 (0,0-30,2)	120,12 (298,46)	0,804	
IL-6	5	1,10 (0,1-12,2)	1,43 (3,27)	9	0,0 (0,0-2,4)	1,51 (2,41)	0,331	
IL-8	6	18,32 (11,7-24,7)	17,04 (9,19)	10	13,83 (0,0-20,4)	11,47 (10,56)	0,322	
TNF-α	6	5,18 (3,5-18,1)	12,00 (18,34)	10	5,54 (4,8-7,0)	7,34 (5,30)	0,871	
IFN-γ	6	0,0 (0,0-0,0)	0,10 (0,26)	10	0,0 (0,0-0,0)	0,76 (2,42)	0,777	
GM-CSF	6	0,0 (0,0-9,3)	3,51 (5,64)	10	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0)	0,06	
IL-2	6	0,0 (0,0-4,1)	2,76 (6,76)	10	0,0 (0,0-0,0)	10,67 (33,74)	0,777	
IL-4	6	15,29 (0,0-19,9)	4,28 (10,49)	10	6,61 (0,0-13,5)	0,0 (0,0)	0,258	
IL-5	6	0,0 (0,0-6,4)	0,0 (0,0-0,0)	10	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0)	0,197	
IL-10	6	15,29 (0,0-19,9)	11,97 (9,72)	10	6,61 (0,0-13,53)	6,84 (7,22)	1,000	
Carbonilas	3	0,26 (0,1-0,0)	0,25 (0,10)	7	0,39 (0,0-0,4)	0,32 (0,22)	0,425	
Sulfidrilas	6	2,80 (1,9-3,5)	2,74 (0,90)	8	3,03 (2,6-4,1)	3,74 (2,28)	0,439	
SOD	6	0,02 (0,0-0,0)	0,03 (0,01)	3	0,03 (0,0-0,0)	0,04 (0,05)	0,953	
GSH	6	1,90 (1,7-2,9)	2,20 (0,65)	10	2,15 (1,8-3,0)	2,43 (0,68)	0,448	

p*: Teste de Mann-Whitney; Mediana (IQ: intervalo interquartil); Phe (fenilalanina) em μmol/L; IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10: (pg/mL); Carbonilas: (nmol/mg); Sulfidrilas: (nmol/mg); SOD: (U/mg); GSH: (nmol/mg).

APÊNDICE IV

Tabela 4- Comparação das concentrações plasmáticas de fenilalanina, citocinas e marcadores de estresse oxidativo apresentadas pelos pacientes com Deficiência de Fenilalanina Hidroxilase responsivos ao BH4 no período após sobrecarga de L-Phe (ponto IIa) e após sobrecarga de L-Phe+BH4 (ponto IIIa)

Variáveis	N	Responsivo ao BH4 (ponto IIa)			Responsivo ao BH4 (ponto IIIa)		
		Mediana (IQ)	Média (±DP)	n	Mediana (IQ)	Média (±DP)	p*
Phe		569,50 (130,25-874,00)	531,0 (349,37)		272,0 (707-683,25)	355,37 (312,15)	0,028
IL-1β	5	3,02 (1,51-54,36)	22,95 (42,59)	5	11,15 (0,0-146,7)	60,91 (90,82)	0,593
IL-6	5	0,48 (0,0-2,98)	1,56 (2,57)	5	1,10 (0,1-12,2)	1,43 (3,27)	0,068
IL-8	6	16,63 (10,36-17,92)	14,09 (7,21)	6	18,32 (11,7-24,7)	17,04 (9,19)	0,080
TNF-α	6	5,06 (3,34-5,72)	4,44 (2,29)	6	5,18 (3,5-18,1)	12,00 (18,34)	0,138
IFN-γ	6	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0)	6	0,0 (0,0-0,0)	0,10 (0,26)	0,317
GM-CSF	6	0,0 (0,0-2,50)	1,67 (4,09)	6	0,0 (0,0-9,3)	3,51 (5,64)	0,180
IL-2	5	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0)	5	0,0 (0,0-4,1)	2,76 (6,76)	1,000
IL-4	6	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0)	6	15,29 (0,0-19,9)	4,28 (10,49)	0,317
IL-5	6	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0)	6	0,0 (0,0-6,4)	0,0 (0,0-0,0)	1,000
IL-10	6	13,29 (0,0-15,59)	9,89 (7,83)	6	15,29 (0,0-19,9)	11,97 (9,72)	0,109
Carbonilas	3	0,17 (0,02-0,22)	0,13 (0,10)	3	0,26 (0,1-0,0)	0,25 (0,10)	0,593
Sulfidrilas	6	2,10 (1,74-2,37)	2,03 (0,42)	6	2,80 (1,9-3,5)	2,74 (0,90)	0,116
SOD	5	0,02 (0,01-0,03)	0,02 (0,01)	5	0,02 (0,0-0,0)	0,03 (0,01)	0,138
GSH	6	1,96 (1,76-3,00)	2,25 (0,61)	6	1,90 (1,7-2,9)	2,20 (0,65)	0,197

p*: Teste de Mann-Whitney; Mediana (IQ: intervalo interquartil); Phe (fenilalanina) em μmol/L; IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10: (pg/mL); Carbonilas: (nmol/mg); Sulfidrilas: (nmol/mg); SOD: (U/mg); GSH: (nmol/mg).

APÊNDICE V

Tabela 5- Comparação das concentrações plasmáticas de fenilalanina, citocinas e marcadores de estresse oxidativo apresentadas pelos pacientes com Deficiência de Fenilalanina Hidroxilase não responsivos ao BH4 no período após sobrecarga de L-Phe (ponto IIa) e após sobrecarga de L-Phe+BH4 (ponto IIIa)

Variáveis	Não Responsivo ao BH4 (ponto IIa)				Não Responsivo ao BH4 (ponto IIIa)		
	N	Mediana (IQ)	Média (±DP)	n	Mediana (IQ)	Média (±DP)	p*
Phe		537,60 (366,50-708,75)	527,30 (191,64)		482 (344,5-738,2)	575,37 (312,15)	0,878
IL-1β	7	5,84 (2,92-44,48)	135,37 (361,17)	7	5,14 (0,0-30,2)	120,12 (298,46)	0,138
IL-6	9	0,10 (0,0-0,95)	1,43 (3,27)	9	0,0 (0,0-2,4)	1,51 (2,41)	1,000
IL-8	10	6,32 (0,0-15,33)	8,56 (9,75)	10	13,83 (0,0-20,4)	11,47 (10,56)	0,046
TNF-α	10	5,36 (5,06-8,53)	8,32 (7,32)	10	5,54 (4,8-7,0)	7,34 (5,30)	0,260
IFN-γ	10	0,0 (0,0-0,0)	4,48 (4,68)	10	0,0 (0,0-0,0)	0,76 (2,42)	0,317
GM-CSF	10	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0)	10	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0)	1,000
IL-2	10	0,0 (0,0-0,0)	16,07 (48,21)	10	0,0 (0,0-0,0)	10,67 (33,74)	0,317
IL-4	10	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0)	10	6,61 (0,0-13,5)	0,0 (0,0)	1,000
IL-5	10	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0)	10	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0)	1,000
IL-10	10	0,0 (0,0-13,49)	5,55 (7,18)	10	6,61 (0,0-13,53)	6,84 (7,22)	0,753
Carbonilas	5	0,29 (0,16-0,73)	0,44 (0,41)	5	0,39 (0,0-0,4)	0,32 (0,22)	0,225
Sulfidrilas	6	1,77 (0,84-4,41)	2,35 (1,94)	6	3,03 (2,6-4,1)	3,74 (2,28)	0,028
SOD	9	0,05 (0,02-0,12)	0,07 (0,07)	9	0,03 (0,0-0,0)	0,04 (0,05)	0,594
GSH	9	2,05 (1,88-2,96)	2,31 (0,56)	9	2,15 (1,8-3,0)	2,43 (0,68)	0,859

Nenhuma comparação foi significativa após a correção de Bonferroni. p: Teste de Mann-Whitney; Mediana (IQ: intervalo interquartis); Phe (fenilalanina) em μmol/L; IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10: (pg/mL); Carbonilas: (nmol/mg); Sulfidrilas: (nmol/mg); SOD: (U/mg); GSH: (nmol/mg).

ANEXO

ANEXO I – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto.

Projeto: 120497

Data da Versão do Projeto:

Pesquisadores:

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

TATIELE NALIN

TÁSSIA TONON

Título: Um estudo clínico sobre a associação entre administração oral de Tetrahydrobiopterina e níveis de citocinas nas hiperfenilalaninemias

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 12 de março de 2013.


Prof. Flávio Kapczinski
Coordenador GPPG/HCPA