

AValiação de parâmetros de estresse oxidativo em cultura primária de astrócitos corticais de ratos tratados com fenilalanina



Elissa Kerli Fernandes, Clovis Milton Duval Wannmacher

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

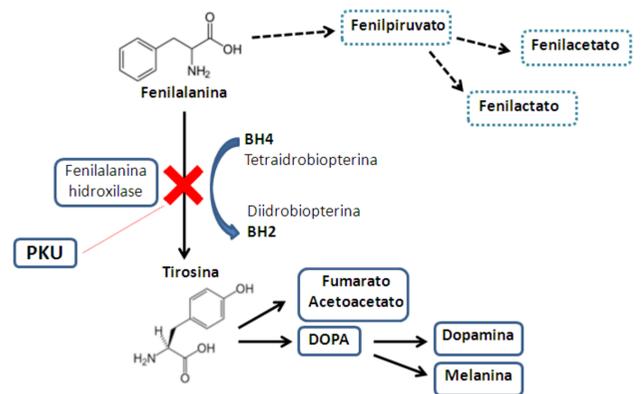


INTRODUÇÃO

A fenilcetonúria (PKU) é o mais comum erro inato do metabolismo. É causada pela deficiência da atividade da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH) ou seu cofator, a tetrahidrobiopterina (BH4), causando o acúmulo de fenilalanina (PHE), por não se transformar em tirosina, e formando fenilcetonas por rotas metabólicas alternativas.

Se não houver um tratamento precoce, pacientes fenilcetonúricos desenvolvem graus variáveis de danos neurológicos, mas os mecanismos pelos quais a fenilalanina provoca lesão cerebral ainda não estão completamente elucidados. Estudos apontam o envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia da fenilcetonúria.

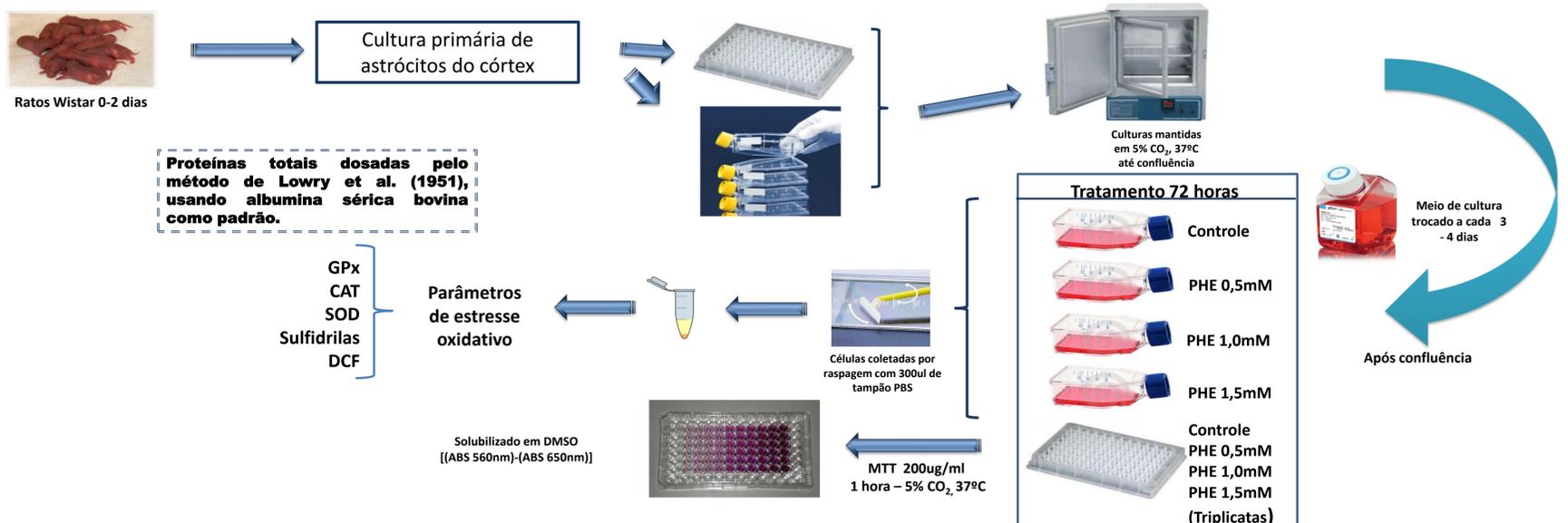
Estresse oxidativo pode ser compreendido como o desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente do aumento da geração de espécies oxidantes, da diminuição dos antioxidantes endógenos ou ambos, causando acúmulo de espécies reativas que podem gerar dano ao DNA, lipídios e proteínas celulares.



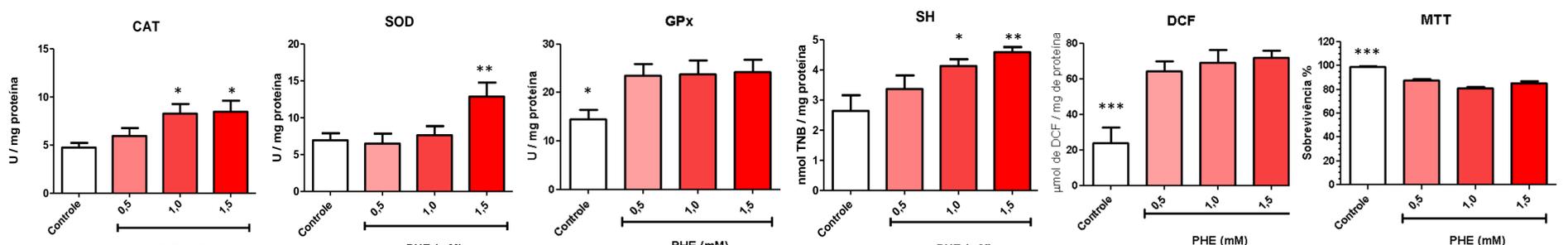
OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da fenilalanina sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo (atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), oxidação de grupos sulfidrilas (SH), oxidação de DCFH (DCF)) e viabilidade celular pelo ensaio com MTT em cultura primária de astrócitos corticais de ratos Wistar.

METODOLOGIA



RESULTADOS



Efeito do tratamento de fenilalanina (PHE) nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 mM sobre a atividade da enzima CAT em cultura de astrócitos corticais. Resultados são expressos em unidades de CAT por mg de proteína. Os dados são apresentados em média ± desvio padrão para n=8. Os dados foram analisados por ANOVA de 1 via, seguida de teste de Tukey. * p < 0,05 comparados com o controle.

Efeito do tratamento de fenilalanina (PHE) nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 mM sobre a atividade da enzima SOD em cultura de astrócitos corticais. Resultados são expressos em unidades de SOD por mg de proteína. Os dados são apresentados em média ± desvio padrão para n=8. Os dados foram analisados por ANOVA de 1 via, seguida de teste de Tukey. ** p < 0,01 comparado com o controle.

Efeito do tratamento de fenilalanina (PHE) nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 mM sobre o conteúdo total de grupos tióis medidos por sulfidrilas em cultura de astrócitos corticais. Resultados são expressos em unidades de GPx por mg de proteína. Os dados são apresentados em média ± desvio padrão para n=8. Os dados foram analisados por ANOVA de 1 via, seguida de teste de Tukey. * p < 0,05

Efeito do tratamento de fenilalanina (PHE) nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 mM sobre o conteúdo total de grupos tióis medidos por sulfidrilas em cultura de astrócitos corticais. Resultados são expressos em nmol de TNB por mg de proteína. Os dados são apresentados em média ± desvio padrão para n=6. Os dados foram analisados por ANOVA de 1 via, seguida de teste de Tukey. * p < 0,05; ** p < 0,01. comparados com o controle

Efeito do tratamento de fenilalanina (PHE) nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 mM sobre o conteúdo total de grupos tióis medidos por sulfidrilas em cultura de astrócitos corticais. Resultados são expressos em µmol de DCF por mg de proteína. Os dados são apresentados em média ± desvio padrão para n=6. Os dados foram analisados por ANOVA de 1 via, seguida de teste de Tukey. *** p < 0,001

Efeito do tratamento de fenilalanina (PHE) nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 mM sobre a viabilidade celular em cultura de astrócitos corticais. Resultados são expressos em porcentagem, considerando o controle como 100%. Os resultados são apresentados em média ± desvio padrão para n=8. Os dados foram analisados por ANOVA de 1, seguida de teste de Tukey. *** p < 0,001

CONCLUSÃO

A Phe reduziu significativamente a viabilidade celular em todas as doses testadas. Além disso, a Phe aumentou significativamente a atividade da CAT nas doses de 1,0 e 1,5 mM, a atividade da SOD na dose de 1,5mM e a atividade da GPx em todas as doses. A Phe também aumentou significativamente o conteúdo total de grupos tiólicos totais nas concentrações de 1,0 e 1,5 mM e aumentou a oxidação de DCFH nas três doses de Phe testadas. Estes resultados sugerem que o estresse oxidativo induzido pela Phe pode ser a causa da morte celular de astrócitos corticais, que pode participar do processo que provoca lesões irreversíveis em pacientes que não seguiram o tratamento adequado.

REFERÊNCIAS

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105:121 – 126
 A.L.A. Ferreira, L. S. Matsubara (1997) Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema antioxidante e estresse oxidativo
 Gottfried C, Valentim L, Salbego C, Karl J, Wofchuk ST, and Rodnight R (1999) Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: Specific effects on the phosphorylation of GFAP, vimentin and heat shock protein 27 (HSP 27). *Brain Res* 833:142–149
 Fernandes, Carolina G. et al. Experimental Evidence that Phenylalanine Provokes Oxidative Stress in Hippocampus and Cerebral Cortex of Developing Rats
 Lowry O H, Rosebrough N, Farr AL, Randal RJ (1951) Protein measurement with a Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
 Nalin, Tatiéle et al. *Phenylketonuria in the Public Health System: Assessment of Adherence to Treatment in a Medical Care Center in Rio Grande do Sul*
 Nedergaard M, Ranson B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *TRENDS Neurosci* 26:523–530
 Zahler WL, Cleland WW (1968) A specific and sensitive assay for disulfides. *J Biol Chem* 243: 716-719