

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Estudos experimentais sobre os mecanismos patogênicos na cistinose: efeitos da cistina sobre alguns parâmetros bioquímicos em rins de ratos jovens

Virginia Cielo Rech

Orientador: Prof. Dr. Clovis Milton Duval Wannmacher

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre

2007

“ Há tanto por desaprender
e tão pouco por viver”

Clovis M. D. Wannmacher

DEDICO esta tese aos meus pais: OLMIR e MARIA, meus primeiros amores, meus primeiros mestres.

Casaram-se com amor e divertiram-se um com o outro. Aliás, bom humor é um bom começo! Sem grandes recursos financeiros e educacionais, e com muito trabalho, criaram suas fortalezas: bens materiais e laços de afeto, e nesses, fomos nos entrelaçando:

PAULO,

ÁLVARO,

EU: VIRGINIA,

MARCELO + MAURO (gêmeos).

Lembro com saudades do caminho ao retornar da escola, o cheirinho de comida saindo pelas janelas, e em casa uma turma ao redor da mesa: nossa turma – pais, irmãos, nossa empregada, e quem chegasse de última hora - as brincadeiras, brigas, implicâncias (ah, os apelidos), muito aprendemos entre irmãos, na família – minha primeira escola. Aos que chegavam: o mate, a conversa ao redor do fogão a lenha e junto, a sensação de pertencer ao lugar.

Admirei ainda mais vocês, quando percebi que sempre aceitaram nossas escolhas, fossem elas profissionais ou amorosas. Pois, normalmente as pessoas querem que nos adaptemos ao mundo delas sem perceber que cada um tem um mundo particular!

Em 2000, um grande amor, minha mãe, se foi. Ela não sabia dizer eu te amo diretamente, então olhava pra mim e dizia que queria ter tido outra filha para ver se seria igual. Entendi a declaração e com o tempo percebemos a necessidade de estarmos próximas.

Dedico também ao meu querido marido, Gilberto Orengo, parceiro de uma longa caminhada e um dos meus grandes amores. Obrigada pela paciência, pela espera e pelo constante apoio para que eu chegasse até aqui.

Nossa família continua crescendo... tem o Gilberto, a Cristiane, a Sandra, a Noeci, a Nilva, os pequenos Luiza, Gabriela, Antônia e o futuro Gustavo. Quando a vida de cada um permite, continuamos a nos reunir em torno da mesa, e todos, tentando se adaptar a um mundo em constante transformação, sem esquecer o embrião do início da história: o carinho pelas pessoas. E o carinho conosco mesmo.

Agradecimentos

Ao meu querido orientador, Clovis Milton Duval Wannmacher, não encontro palavras pra expressar a tua importância nesse trabalho, porque além de ter crescido muito profissionalmente, o convívio diário me propiciou aprender sobre um profissional que após muitos anos, ainda se preocupa com o crescimento da instituição (Departamento de Bioquímica) em que trabalha, demonstrando o bom profissional e o carinho e seriedade pelo local que ajudou a construir. Também recorro de nossas conversas sobre arte, política, religião, sobre escutar as pessoas e simplesmente aceita-las como são. Isso tudo se incorpora ao meu jeito. “Adsorvemos” um pouquinho das pessoas com que convivemos e se isso ocorreu contigo, fico muito grata e feliz.

Aos bolsistas, Genaro, Paula, Junior, Letícia, Gustavo, Maria Fernanda, Micheli, Denises, Tatiana, Elenara, que tarde da noite ajudavam nos experimentos e de brinde, vinham acompanhados de bom-humor.

Aos colegas Adriana, Tatiana, Andréa, Carmem, Elisa, Maria da Graça, Rochele, Paulo Ricardo, Simone, obrigada pela parceria (discussões, ajuda nos experimentos, bate-papo durante os cafézinhos) nessa caminhada.

À colega Luciane, pelos primeiros experimentos ensinados, mas principalmente pela amiga que ganhei.

Ao grupo de Erros Inatos do Metabolismo, professores: Carlos Severo Dutra-Filho, Moacir Wajner e Ângela T. S. Wyse, porque fortificou a idéia de que um grupo tem melhores condições intelectuais (nossos seminários), financeiras (troca de materiais) e fortalece a amizade entre os integrantes (apesar de cada um ter sua peculiaridade) e a todos os colegas do grupo pela parceria e carinho durante esses anos.

À turma do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial à professora Janice C. Coelho, aos colegas Kristiane Michelin e Alessandro Wajner pelo inestimável auxílio em parte do meu trabalho.

Aos funcionários e professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica, pelo imprescindível apoio.

Aos órgãos financiadores de pesquisa: CNPq, FINEP, CAPES, FAPERGS e PROPESP / UFRGS.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| I – Introdução | 11 |
| 1.1 – Um breve Histórico dos Erros Inatos do Metabolismo..... | 11 |
| 1.2 - Conceito de Erros Inatos do Metabolismo | 13 |
| 1.3 – Classificação dos Erros Inatos do Metabolismo | 13 |
| 1.4 – Sintomatologia dos Erros Inatos do Metabolismo | 15 |
| 1.5 – Frequência dos Erros Inatos do Metabolismo..... | 16 |
| 1.6 – Estudos de Erros Inatos do Metabolismo em Animais | 17 |
| 2.1 -..... | 18 |
| Histórico | 18 |
| 2.2 – Conceito de Cistinose | 20 |
| 2.3 – Propriedades Químicas e Síntese da Cistina..... | 21 |
| 2.4 – Quem são os Lisossomos e qual é o papel dessas organelas?..... | 21 |
| 2.5 – Cistinosina..... | 22 |
| 2.6 – A Rota da Cistina e da Cisteína até os lisossomos..... | 23 |
| 2.7 – Características Clínicas..... | 25 |
| 2.7.1 – Achados Renais | 25 |
| 2.7.2 – Envolvimento Sistêmico antes do Transplante Renal..... | 26 |
| 2.7.3 – Envolvimento Sistêmico após o Transplante Renal..... | 26 |
| 2.8 – Características Patológicas | 27 |
| 2.9 - Diagnóstico | 28 |
| 2.10 – Como é o tratamento? E qual é o mecanismo de ação da droga? | 28 |
| 2.10.1 – Tratamento paliativo..... | 29 |
| 2.10.2 – Tratamento Específico..... | 29 |
| 2.11 – E quando o transporte lisossomal de cistina estiver defeituoso? | 30 |
| 2.12 – A depleção da cistina pela cisteamina. | 31 |
| 2.13 - Qual é a dose de cisteamina indicada? | 32 |
| 2.14 – Relação entre Cistinose e Apoptose | 32 |
| 5.1 – O que é Estresse Oxidativo?..... | 40 |
| 5.2 – Radicais Livres e Espécies Reativas: Os Oxidantes! | 40 |
| 5.3 - Fontes Oxidativas..... | 41 |
| 5.4 - Marcadores do Estresse Oxidativo..... | 44 |
| 5.5 - Sistemas de Defesa Antioxidantes | 47 |
| II – Objetivos..... | 49 |
| III - Resultados | 50 |
| <i>Artigo 1</i> | 50 |
| <i>Artigo 2</i> | 75 |
| <i>Artigo 3</i> | 98 |
| IV – Discussão..... | 121 |
| V – Conclusões..... | 131 |
| VI – Perspectivas..... | 135 |
| VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS | 136 |

Resumo

A cistinose é uma doença genética letal causada pelo transporte deficiente de cistina para fora dos lisossomos, levando ao acúmulo intralisossomal de cistina na maioria dos tecidos, principalmente no rim. O tratamento precoce com cisteamina, um aminotiol capaz de remover a cistina acumulada nos lisossomos, retarda a evolução da doença. Embora o dano tecidual dependa do acúmulo do dissulfeto cistina, os mecanismos responsáveis por este dano ainda não estão esclarecidos. A sobrecarga de lisossomos com dimetil cistina éster tem sido usada para estudar a patogênese da cistinose. Túbulos renais proximais isolados de ratos e de coelhos, sobrecarregados com dimetil cistina éster desenvolveram deficiência na reabsorção tubular semelhante à observada na síndrome de Fanconi, a principal manifestação clínico-laboratorial da cistinose. Estudos realizados com fibroblastos de pacientes cistinóticos e com células tubulares renais sobrecarregadas com dimetil cistinal éster sugerem que a apoptose está aumentada nesta doença. O acúmulo de cistina também induz queda nos níveis intracelulares de glutatona e de ATP, mesmo com a capacidade mitocondrial geradora de ATP intacta.

Considerando que a creatinaquinase é uma enzima tiólica crítica para a homeostasia energética renal e que pode ser alterada por dissulfetos, nós investigamos os efeitos *in vivo* e *in vitro* da cistina sobre a atividade desta quinase em rim de ratos Wistar jovens. Os resultados mostraram que a cistina inibiu a atividade da creatinaquinase *in vivo* e *in vitro*. A inibição foi do tipo não competitivo e dependente da concentração do inibidor e do tempo de pré-incubação, sendo prevenida e revertida por cisteamina e por glutatona, sugerindo a oxidação de grupos tiólicos essenciais para o funcionamento da enzima

Com o objetivo de investigar se a inibição causada pela cistina era específica para a creatinaquinase renal ou poderia ocorrer também com outras enzimas tiólicas de outros tecidos, nós estudamos os efeitos da sobrecarga de dimetil cistina éster sobre as enzimas tiólicas creatinaquinase e piruvatoquinase, bem com sobre a enzima não tiólica lactato desidrogenase, em rim e córtex cerebral de ratos Wistar jovens. Os animais foram injetados subcutaneamente com dimetil cistina éster na dose de 1,6 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal e/ou cisteamina na dose de 0,46 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal do décimo sexto ao vigésimo dia de vida, tendo sido mortos por decapitação sem anestesia 12 horas após a última injeção. A administração de cistina dimetiléster diminuiu a relação tiol/dissulfeto sem alterar a atividade da lactato desidrogenase, mas inibiu a atividade das duas quinases, tanto no rim, quanto no córtex cerebral. A administração de cisteamina normalizou a relação tiol/dissulfeto e a atividade das duas quinases em ambos tecidos, reforçando a hipótese de que a cistina causa a inibição de enzimas tiólicas, provavelmente por meio da oxidação de grupos tiólicos essenciais para o funcionamento destas enzimas.

Considerando que a cistina é um potencial oxidante e o estresse oxidativo pode alterar a função das proteínas tiólicas e induzir apoptose, nós investigamos os efeitos da sobrecarga de cistina dimetiléster sobre vários parâmetros de estresse oxidativo em rim de ratos Wistar jovens. A cistina dimetiléster induziu lipoperoxidação, carbonilação de proteínas, e estimulação da atividade da superóxido dismutase, glutatona peroxidase e catalase, provavelmente por meio da formação de ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilas. A administração de cisteamina preveniu, ao menos em parte, estes efeitos, sugerindo que este aminotiol aja como um “scavenger” de radicais livres.

Considerando todos os resultados em conjunto, podemos presumir que a cistina induz estresse oxidativo, inibindo enzimas tiólicas com consequentes alterações metabólicas, tais como diminuição da homeostasia metabólica e redução dos níveis dos antioxidantes piruvato, creatina e possivelmente glutatona. Se estes efeitos também ocorrerem nos pacientes cistinóticos, eles poderiam contribuir para o dano celular que ocorre nesta doença.

Abstract

Cystinosis is a lethal genetic disease caused by a lysosomal transport deficiency of cystine, leading to intra-lysosomal cystine accumulation in most tissues, specially in kidney. Early treatment with cysteamine, a cystine-depleting aminothioliol, extends life of affected patients. Although tissue damage might depend on accumulation of the disulfide cystine, the mechanisms of tissue damage are not fully understood. Lysosomal loading with cystine dimethyl ester has been used for studying the pathogenesis of cystinosis. Isolated proximal renal tubules from rats and rabbits loaded with CDME developed defective proximal tubular reabsorption, similar to that of Fanconi syndrome in cystinosis. Studies performed in fibroblasts of cystinotic patients and in kidney cells loaded with cystine dimethyl ester suggest that apoptosis is enhanced in this disease. Cystine accumulation also induces decrease of glutathione and of intracellular ATP content with intact energy generating capacity of mitochondria.

Considering that creatine kinase, a thiol-containing enzyme, is critical for renal energy homeostasis and may be altered by disulfides, we investigated the *in vivo* and *in vitro* effects of cystine on this kinase in the kidney of young Wistar rats. Results showed that cystine inhibited *in vivo* and *in vitro* the enzyme activity and that this inhibition was of the non competitive type, time and concentration dependent, prevented and reversed by cysteamine and glutathione, suggesting that creatine kinase inhibition was caused by oxidation of essential sulfhydryl groups necessary for the enzyme function. Next, to investigate whether this inhibition was specific for renal creatine kinase, or might occur for other thiol-containing enzymes in other tissues, we studied the effects of cystine dimethylester load on the thiol-containing enzymes creatine kinase and pyruvate kinase, in the kidney and brain of young Wistar rats. We also studied these effects on lactate dehydrogenase, a non-containing thiol enzymae. The animals were injected twice a day with 1.6 $\mu\text{mol/g}$ body weight cystine dimethylester and/or 0.46 $\mu\text{mol/g}$ body weight cysteamine from the 16th to the 20th postpartum day and killed after 12 hours. Cystine dimethylester administration decreased thiol/disulfide ratio and inhibited the two enzyme activities in tissues, but not lactate dehydrogenase activity, a non-containing thiol enzyme. Co-administration of cysteamine normalized thiol/disulfide ratio and the two enzyme activities, reinforcing the hypothesis that cystine inhibits thiol containing enzymes possibly through oxidation of essential thiol groups of the enzymes.

Considering that cystine is a potential oxidant and oxidative stress is known to alter the function of thiol containing proteins and induce apoptosis, we investigated the effects of cystine dimethyl ester loading on several parameters of oxidative stress in the kidney of young rats. Cystine dimethyl ester induced lipoperoxidation, protein carbonylation, and stimulated superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities, probably through the formation of superoxide anions, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals. Co-administration of cysteamine prevented, at least in part, those effects, possibly acting as a scavenger of free radicals.

Taken together all the results, it can be presumed that cystine induces oxidative stress inhibiting thiol-containing enzymes with consequent metabolic alterations such as diminution of energy homeostasis and reduction levels of the antioxidants pyruvate, creatine, and possibly glutathione. If these effects also occur in cystinotic patients, they could contribute to tissue damage that occurs in this disease.

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Esquema adaptado do Sistema de Transporte Lisossomal Específico para Cisteína de Pisoni et al, 1990..... | 24 |
| Figura 2 - Estrutura da cisteamina, que depleta a cistina celular..... | 30 |
| Figura 3 - Depleção da cistina pela cisteamina, fonte: Gahl et al., 2001..... | 31 |
| Figura 4 - Reação catalítica da creatinaquinase..... | 33 |
| Figura 5 - Circuito da fosfocreatina, fonte: Wallimann et al., 1994..... | 35 |
| Figura 6 - Reação catalítica da creatinaquinase..... | 38 |
| Figura 7 - Representação das etapas da lipoperoxidação..... | 45 |
| Figura 8 - Principais alvos das substâncias oxidantes..... | 46 |

Lista de Quadros

| | |
|--|----|
| Quadro 1 - Classificação dos EIM de acordo com a área do metabolismo afetada..... | 15 |
|--|----|

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Síntese das principais ROS e RNS..... | 44 |
| Tabela 2 - Exemplo de antioxidante não-enzimático..... | 48 |
| Tabela 3 - Principais antioxidantes enzimáticos | 49 |

Lista de Abreviaturas

| | |
|-------------------------------|---|
| ADP | Adenosina difosfato |
| ANT | transportador adenina nucleotídeo |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| Ca ²⁺ | íon cálcio |
| CAT | Catalase |
| CDME | dimetil cistina éster, em inglês: cystine dimethylester |
| CK | creatinaquinase |
| CO ₂ | gás carbônico |
| Cr | Creatina |
| CSH | cisteamina |
| e ⁻ | Elétron |
| EIM | erros inatos do metabolismo |
| FBP | frutose – 1,6 - bifosfato |
| GPx | Glutathione peroxidase |
| GSH | Glutathione reduzida |
| GSSG | Glutathione oxidada |
| H ⁺ | Próton |
| H ₂ O | Água |
| H ₂ O ₂ | peróxido de hidrogênio |
| K ⁺ | íon potássio |
| L · | radical lipídico |
| LOO · | radical peroxila |
| LOOH | hidroperóxido lipídico |
| Mg ²⁺ | íon magnésio |

| | |
|-----------------------------|---|
| Mi _s -CK | creatinaquinase mitocondrial sarcomérica |
| Mi _u -CK | creatinaquinase mitocondrial ubíqua |
| MM-CK | creatinaquinase citosólica muscular |
| Na ⁺ | íon sódio |
| NADH | nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida) |
| O ₂ | oxigênio molecular |
| O ₂ ⁻ | radical ânion superóxido |
| · OH | radical hidroxila |
| PCr | fosfocreatina |
| PEP | fosfoenolpiruvato |
| Pi | fosfato inorgânico |
| PK | piruvatoquinase |
| SOD | superóxido dismutase |

I – INTRODUÇÃO

1 - Erros Inatos do Metabolismo

1.1 – Um breve Histórico dos Erros Inatos do Metabolismo

Os dados históricos aqui apresentados foram retirados de Childs et al, 2001.

O termo erro inato do metabolismo (EIM) foi sugerido em 1909 por Archibald Garrod, a partir de estudos com pacientes que apresentavam alcaptonúria, albinismo, cistinúria e pentosúria. Ele verificou que as doenças apresentavam uma distribuição familiar e ocorriam, com maior frequência, nos filhos de casamentos consangüíneos. Esses casos poderiam ser explicados por defeitos hereditários e de herança autossômica recessiva, baseado nas leis de Mendel. A partir de suas observações, Garrod desenvolveu o conceito de que algumas doenças ocorriam por causa da deficiência de uma enzima responsável por uma rota metabólica. A alcaptonúria, por exemplo, acontece por uma deficiência na oxidação do ácido homogentísico, um metabólito da tirosina.

Os postulados básicos de Garrod foram reforçados e aprimorados por Beadle e Tatum (um gene – uma enzima), onde um gene específico está relacionado à síntese de uma cadeia polipeptídica específica. Em 1948, Gibson demonstrou o primeiro defeito enzimático em uma doença genética humana, a deficiência de uma enzima NADH-dependente, necessária para a redução da meta-hemoglobina, na meta-hemoglobinemia recessiva. Trabalhos de Pauling e colaboradores em 1949 e de Ingram em 1956, mostrando que a alteração molecular da hemoglobina de pacientes com a anemia falciforme produzia um padrão diferente de migração eletroforética forneceu a primeira evidência direta de que mutações humanas realmente produzem uma alteração na estrutura primária das proteínas. Essas descobertas permitiram que o conceito de EIM fosse ampliado para proteínas não

enzimáticas, surgindo o conceito de “doença molecular” onde genes mutantes levam à produção de proteínas anormais cuja atividade funcional está alterada (Beaudet et al, 1989).

Tão grande tem sido o desenvolvimento dos aspectos moleculares da genética dos EIM, que o livro mais importante da área, publicado periodicamente desde 1960 com o título: “The Metabolic Basis of Inherited Disease”, em sua 7ª edição mudou o título para: “The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease” (Scriver et al., 1995).

No final da década de 80, doenças como o câncer e a deficiências do sistema imunológico foram incluídas entre os EIM (Scriver et al., 1995). Deste modo, o erro inato passou a ser uma idéia central na medicina.

Desde o estudo inicial de Garrod em 1909, sobre os 4 erros inatos, o conhecimento destas doenças metabólicas tem crescido geometricamente. Foram descritos até o momento mais de 500 EIM (Scriver et al., 2001), a maioria envolvendo processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo, causando um grande número de defeitos, com quadros clínicos diversos, que podem ser desde assintomáticos até tão graves que causem morte neonatal (Benson e Fenson, 1985). Os EIM manifestam-se geralmente na infância, apresentando sinais e sintomas semelhantes aos encontrados em muitas doenças infantis (Holtzman, 1978).

É salientado por Scriver e colaboradores no prefácio de seu livro (Scriver et al., 2001): "a importância da observação de Garrod que os EIM são manifestações de individualidade bioquímica não foi reconhecida durante toda sua vida e nem nos dias de hoje, pois muitos médicos ainda pensam nas doenças metabólicas herdadas como situações de extrema raridade, que nunca serão vistas na prática médica de rotina. Os EIM produzem manifestações em cada órgão, desde a vida fetal à geriátrica e são onipresentes na sua aparência, não respeitando as qualificações do médico - generalista ou especialista".

1.2 - Conceito de Erros Inatos do Metabolismo

Os EIM são doenças hereditárias causadas por uma deficiência parcial ou total de uma proteína, geralmente uma enzima. A deficiência ou ausência na atividade dessa enzima pode causar bloqueio de uma rota metabólica, causando acúmulo tóxico de substâncias e/ou falta de produtos essenciais gerando muitas vezes prejuízo no desenvolvimento mental e/ou físico dos indivíduos afetados (Scriver et al, 2001).

1.3 – Classificação dos Erros Inatos do Metabolismo

Em 1982, Sinclair propôs uma classificação para os EIM:

1. *Doenças de Transporte*: são aquelas que afetam o transporte renal e/ou intestinal de moléculas inorgânicas ou orgânicas e determinam graus variáveis de depleção tecidual e desnutrição. Ocorrem perdas renais primárias ou secundárias à absorção de metabólitos intestinais. São exemplos deste grupo as deficiências de dissacaridases, defeitos no transporte de magnésio, Doença de Hartnup, entre outros.

2. *Doenças de Armazenamento, Degradação e Secreção*: em sua maioria envolvem o aparelho de Golgi ou os lisossomos e determinam o acúmulo de macromoléculas e conseqüentes alterações patológicas nos tecidos onde o defeito se manifesta. A terapêutica depende da reposição da enzima, do tecido, ou do órgão, e ainda está em fase experimental. São exemplos deste grupo as doenças lisossômicas de depósito, as glicogenoses e a cistinose.

3. *Doenças de Síntese*: são aquelas em que há síntese incompleta ou anormal de moléculas biologicamente importantes, como hormônios, moléculas de função estrutural ou imunológica, proteínas plasmáticas e enzimas destinadas ao plasma. Nesse último caso, ocorre hiperplasia do órgão que produz a molécula deficiente. A terapêutica da reposição é

freqüentemente eficiente. Um exemplo típico é a hiperplasia adrenal congênita por deficiência de 21-hidroxilase da rota da síntese do cortisol.

4. *Doenças do Metabolismo Intermediário*: são aquelas que comprometem as vias de metabolização de pequenas moléculas. O defeito enzimático pode ocorrer em rotas metabólicas importantes (ciclo dos ácidos tricarboxílicos e ciclo da uréia). A gravidade e a forma de instalação da doença dependem normalmente do grau da deficiência enzimática e da rota metabólica comprometida. Costumam piorar por infecções e outros fatores que aumentam o catabolismo. É comum nessas doenças o acúmulo de metabólitos tóxicos nas células, provocando alterações bioquímicas locais e dano tecidual. Os metabólitos são liberados na circulação e eliminados na urina e podem provocar danos em outros tecidos, quando suscetíveis à sua toxicidade. Algumas doenças deste grupo costumam responder bem à restrição dietética. São exemplos deste grupo, os defeitos no ciclo da uréia, os distúrbios do metabolismo da frutose, galactose e pentoses, os distúrbios do metabolismo dos aminoácidos, dos ácidos orgânicos, as porfirias e os distúrbios do metabolismo das purinas.

Outra classificação (quadro -1) dos EIM, leva em conta a *área do metabolismo afetada* (Scriver et al, 2001):

Quadro 1 - Classificação dos EIM de acordo com a área do metabolismo afetada (Scriver et al, 2001).

| |
|--------------------------------|
| EIM dos aminoácidos |
| EIM dos ácidos orgânicos |
| EIM dos glicídios |
| EIM dos glicosaminoglicanos |
| EIM das glicoproteínas |
| EIM das purinas e pirimidinas |
| EIM das enzimas eritrocitárias |
| EIM dos metais |
| EIM das lipoproteínas |
| EIM dos hormônios |
| EIM das proteínas plasmáticas |

1.4 – Sintomatologia dos Erros Inatos do Metabolismo

Os EIM apresentam manifestações clínicas muito variadas e inespecíficas. A variação ocorre por diferenças no grau de deficiência enzimática, área do metabolismo e tecidos afetados. Algumas delas ocorrem com maior frequência, como por exemplo, deficiências no crescimento, vômito, diarreia, letargia, coma, convulsões, dificuldade alimentar, hipotonia, dificuldades respiratórias, apnéia, hepatomegalia, odor anormal na

urina ou na pele, anormalidades oculares, atraso no desenvolvimento psicomotor e, principalmente, retardo mental progressivo (Burton et al, 1987; Scriver et al, 2001).

1.5 – Frequência dos Erros Inatos do Metabolismo

Em 1986, os EIM compreendiam mais de três centenas de distúrbios genéticos (Mckusick, 1986). Em 2001, ultrapassaram cinco centenas de distúrbios (Scriver 2001).

De forma individual, cada EIM é uma doença rara, mas como um grupo, apresentam uma frequência relativamente alta, podendo ocorrer aproximadamente um caso para cada mil nascimentos vivos (Giugliani et al, 1988; Lubs et al, 1977).

Em estudo realizado em unidades pediátricas de tratamento intensivo em Porto Alegre (Brasil), a frequência dos EIM encontrada em pacientes selecionados através de sintomas e sinais sugestivos foi de 1:15 (Wajner, 1986).

Coelho et al (1997) realizaram estudos no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Brasil) com 10.000 pacientes que apresentavam sinais e sintomas sugestivos de EIM entre 1982 e 1995 usando protocolos específicos que incluíram testes para detecção de glicosaminoglicanos, aminoácidos, monossacarídeos, oligossacarídeos e outros metabólitos. O estudo revelou 647 casos de EIM (6,5%), valor similar ao registrado por Wannmacher et al (1982). A maior incidência de EIM foi observada nos grupos de distúrbios lisossômicos de depósito (59,8%), seguida das aminoacidopatias (21,2%). As desordens mais frequentemente diagnosticadas foram a fenilcetonúria clássica (PKU) (9,1%), gangliosidose GM₁ (9,1%), mucopolissacaridose tipo I (8,3%), mucopolissacaridose tipo VI (6,0%) e leucodistrofia metacromática (4,9%). Além disso, o desenvolvimento de novas técnicas para diagnosticar EIM certamente levará à descoberta de novas doenças, tendendo a aumentar a frequência destes distúrbios.

1.6 – Estudos de Erros Inatos do Metabolismo em Animais

Nenhum modelo animal, químico ou genético, é capaz de mimetizar integralmente a doença humana devido às peculiaridades genéticas e ambientais de cada espécie. No entanto, os modelos permitem estudar a evolução da doença e isolar cada um dos fatores patogênicos presumíveis e associá-los da maneira desejada, obtendo informações impossíveis de conseguir nos pacientes (Bulfield, 1980; Herschkowitz, 1982). Quase duas décadas depois, pelo menos no que diz respeito aos erros inatos que afetam o sistema nervoso, esta afirmativa parece ser tão atual quanto no dia em que foi escrita. Muitos passos podem ser conhecidos, como a atividade enzimática anormal, a qual pode ser devida a uma estrutura anormal da proteína enzimática ou uma quantidade diminuída da mesma. Metabólitos anormais podem estar presentes, ou metabólitos normais podem se acumular intracelularmente. Algumas vezes, a localização celular do defeito é conhecida, assim como as estruturas cerebrais que são afetadas pelo metabolismo anormal. Mas esta gama de informações ainda não explica completamente os distúrbios funcionais freqüentemente observados nos erros inatos, e o preenchimento desta lacuna parece envolver questões de difícil resolução, como a determinação da hierarquia das causas, a distinção entre o que é causa e efeito, e a determinação de como estrutura e função se relacionam, tanto no âmbito molecular quanto celular. Neste sentido, o estudo de modelos animais de erros inatos do metabolismo humano parece ser de grande valia para investigar a patogenia destas doenças. Embora nenhum modelo animal possa reproduzir completamente a doença humana, eles podem auxiliar a compreender pelo menos alguns aspectos da doença. Além disso, as vantagens de se estudar tais modelos incluem a possibilidade de investigar indivíduos com características genéticas muito semelhantes, o que dificulta a interferência de fatores relacionados à variabilidade genética, estudar os mecanismos patogênicos através de uma abordagem compreensiva e multidisciplinar, realizar o estudo durante o desenvolvimento dos vários estágios da doença, e não só na sua

fase terminal e irreversível; facilitar a dosagem de metabólitos nos compartimentos intra e extracelular, e estabelecer um controle rígido sobre as condições ambientais. Estes modelos animais valem-se, portanto, de abordagens não possíveis de serem realizadas em seres humanos, além de permitirem separar possíveis fatores causadores das patologias (Lo, 1996).

2 - Cistinose

2.1 - Histórico

Os dados históricos aqui apresentados foram retirados de Gahl et al. (2001) ou de textos citados.

A cistinose foi reconhecida pela primeira vez como uma entidade clínica por Abderhalden em 1903. Ele descreveu várias crianças que apresentavam acúmulo anormal de cistina, uma das quais apresentava crescimento deficiente aos 21 meses de idade. Demonstrou, por meio de análise química clássica, que lesões pontuais claras nos órgãos internos dessa criança eram constituídas pelo aminoácido cistina. Infelizmente, Abderhalden também descreveu várias crianças com cálculos urinários de cistina e excesso de cistina na urina, levando a uma persistente confusão entre cistinose e cistinúria.

Lignac em 1924, descreveu depósitos de cistina em crianças com raquitismo, nanismo, doença renal e assim ajudou a delinear aspectos clínicos da cistinose. Em 1931, Fanconi descreveu uma criança com glicosúria não-diabética. Em 1935, Toni descreveu uma criança com raquitismo resistente à vitamina D, fraturas espontâneas, nanismo, hipofosfatemia, acidose, albuminúria e glicosúria. Um relato de Debré e colaboradores, em 1934, a respeito de uma criança com características semelhantes, levou à caracterização de uma condição denominada Síndrome de Toni-Debré-Fanconi. Bickel e colaboradores em

1952, forneceram evidências da associação com cistinose com a Síndrome de Fanconi e com dano glomerular progressivo.

Experimentos com animais que receberam cistina oralmente ou intravenosamente apresentaram uma severa toxicidade renal e lesões renais como uma massiva proteinúria, células tubulares renais dilatadas e cilindros renais. Nenhum dos demais aminoácidos testados afetou os rins, com exceção da tirosina que também é relativamente insolúvel. Em 1947, Dent estudou a aminoacidúria na cistinose e a extensão da poliúria, glicosúria, fosfatúria e proteinúria. Ele também percebeu que a aminoacidúria generalizada na cistinose não era proveniente da sobrecarga desses aminoácidos no plasma e que nenhum erro óbvio no metabolismo do aminoácido enxofrado era apresentado pelos pacientes. A distinção clara entre cistinose e cistinúria foi pela primeira vez bem definida em 1949, quando a natureza familiar de ambas foi reconhecida, assim como a raridade da presença de cálculos urinários de cistina em pacientes cistinóticos.

Foi difícil identificar a localização dos cristais de cistina, mas Barr e Bickel, em 1951, concluíram corretamente que eles estavam dentro das células no retículo endotelial. Estudos histológicos em rins cistinóticos, realizados por Clay e colaboradores, em 1953, demonstraram que muitos néfrons eram hipotróficos, particularmente nos túbulos contorcidos proximais, com estreitamento na primeira parte dos túbulos formando uma lesão denominada de “pescoço de cisne”. Essas lesões não são características específicas para cistinóticos, mas são vistas em outras condições renais. Em 1962, microscopia eletrônica de uma amostra de biópsia renal demonstrou cristais hexagonais nos túbulos renais e a deformidade “pescoço de cisne” do túbulo proximal foi confirmado em microscopia de luz. Foi observado a vacuolização e intumescência do retículo endoplasmático e foram encontrados corpos citoplásmicos nas porções apical e central da célula, freqüentemente com grossos grânulos nos túbulos contorcidos proximais.

Concluíram que a cristalização da cistina dentro das células, secundária a algum defeito metabólico ou enzimático desconhecido, levou à patologia renal.

A era moderna de investigação clínica para a cistinose começou em 1967 quando a localização intracelular do depósito de cistina foi identificada nos lisossomos. Isto foi demonstrado por centrifugação diferencial de frações subcelulares de fibroblastos e linfócitos.

O próximo estágio foi investigar a hipótese de que o transporte de pequenas moléculas através da membrana lisossomal era mediado por um transportador. Para tal investigação, leucócitos polimorfonucleares foram carregados com altas concentrações de cistina por exposição ao dimetil cistina éster (CDME = cystine dimethylester), e assim como ocorreu com outros aminoácidos metilésteres, foi hidrolisado especificamente nos lisossomos, formando metanol e cistina livre. A idéia de Tietze, testada no laboratório de Schulman no início da década de 80, de verificar o egresso de cistina usando leucócitos de pessoas normais e cistinóticas, com ^{35}S -cistina ou cistina não radioativa, revelou a perda rápida de cistina das células normais ($t_{1/2} = 45$ min) e a perda lenta da cistina em células cistinóticas ($t_{1/2} \cong$ infinito). Outros testes realizados com cultura de fibroblastos de pessoas normais e de cistinóticas, expostas a uma mistura do dissulfeto, cisteína e glutathiona por 24 h, revelaram que as células normais perdem metade da cistina em 20 minutos, enquanto as células cistinóticas praticamente nada perderam em 90 minutos.

Em 1995, o gene da cistinose foi localizado no cromossomo 17p por um grupo de investigadores. Em 1998, o gene foi isolado e várias mutações foram identificadas.

2.2 – Conceito de Cistinose

CISTINOSE é uma desordem autossômica recessiva com uma incidência estimada de 1 caso para 100.000 a 200.000 nascidos vivos. Na cistinose nefropática, a cistina livre é acumulada continuamente nos lisossomos, formando cristais intracelulares na maioria dos

tecidos. De forma paralela, a aquisição de informações clínicas e básicas sobre cistinose nas últimas 4 décadas cristalizou a compreensão da causa e tratamento desta doença previamente enigmática. Considerando a relativa eficácia da terapia, o diagnóstico e o tratamento precoces tornaram-se críticos.

2.3 – Propriedades Químicas e Síntese da Cistina

Cistina é um dissulfeto formado por oxidação direta de 2 aminoácidos cisteínas. Cistina e cisteína participam de uma reação reversível de oxirredução. Na presença de oxigênio, a cisteína é rapidamente oxidada a cistina. A cistina é muito pouco solúvel em água, aproximadamente 0,5 mM à temperatura ambiente e pH 7,0.

A baixa solubilidade da cistina em meio aquoso leva à formação de cristais de cistina na urina, com conseqüente formação de cálculo renal, na doença conhecida como cistinúria. Essa doença é causada por um defeito na reabsorção tubular renal de cistina e de aminoácidos dibásicos. O plasma humano à temperatura de 37 °C e pH 7,3, pode dissolver aproximadamente 1,7 mM de cistina.

O aminoácido cisteína é originado pela hidrólise da cistationina, que é formada pela combinação dos aminoácidos homocisteína e serina. A cadeia lateral da cisteína contém um grupo sulfidril (-SH), o qual é um importante componente do sítio ativo de muitas enzimas. Em proteínas, 2 grupos -SH de dois resíduos de cisteína podem se oxidar formando 1 resíduo de cistina, que contém uma ligação covalente denominada ponte dissulfeto (-S-S-). A cistina é reduzida a cisteína utilizando NADH + H⁺ como agentes redutores.

2.4 – Quem são os Lisossomos e qual é o papel dessas organelas?

Desde as descobertas do compartimento lisossomal por de Duve em 1959, muito se tem aprendido sobre a função lisossomal na saúde e na doença. Os lisossomos representam

o destino final para muitas moléculas que sofreram endocitose, autofagia ou secreção e, cujo alvo é a destruição ou a reciclagem.

Portanto, várias funções, incluindo a renovação das proteínas celulares, regulação dos receptores de membrana, liberação dos nutrientes captados, inativação de organismos patogênicos, reparo da membrana plasmática, entre outras, dependem da função lisossomal normal. A importância fisiológica dos lisossomos é realçada ainda mais pelas doenças resultantes de defeitos na biogênese lisossomal e capacidade degradativa normal.

Os lisossomos podem ser morfológicamente muito heterogêneos devido às suas numerosas funções celulares e variações no conteúdo. Especificamente, os lisossomos são definidos como organelas ácidas delimitadas por membranas e ricas em hidrolases. Um papel crucial do fechamento da membrana entre endossomos tardios e lisossomos é separar o potencial das hidrolases ácidas de outros constituintes celulares, protegendo-os assim de uma degradação não desejada.

Um determinado número de proteínas da membrana lisossomal deve mediar as funções essenciais dessa organela. Por exemplo, a acidificação do lúmen lisossomal por uma bomba de próton, bem como a translocação de aminoácidos, ácidos graxos e carboidratos resultantes da degradação hidrolítica e dos nutrientes liberados por hidrolases lisossomais específicas (Vitamina B₁₂ e colesterol), têm sido atribuídos às proteínas integrais da membrana lisossomal com a finalidade de manter a homeostasia da célula (Eskelinen et al., 2003). A importância desses sistemas de transporte em mediar a saída dos metabólitos dos lisossomos torna-se especialmente clara nas doenças genéticas letais, como a cistinose nefropática (Pisone et al., 1990; Hirota et al., 2004)

2.5 – Cistinosina

Os aminoácidos são translocados através da membrana lisossomal por transportadores. A **CISTINOSINA**, uma proteína transportadora de cistina já foi

identificada e clonada. O gene CTNS que codifica a cistinosina está mutado em pacientes com cistinose (Eskelinen et al., 2003). A cistinosina contém 367 aminoácidos e 7 domínios transmembrana. Todos os pacientes com cistinose parecem ter mutações no gene CTNS (Gahl et al., 2002).

2.6 – A Rota da Cistina e da Cisteína até os lisossomos

Pisoni et al, 1990, demonstraram que o sistema de transporte lisossomal, altamente específico para a cisteína, fornece a rota principal para a entrega da cisteína ao compartimento lisossomal. Em relação aos fibroblastos cistinóticos ou normais, a habilidade desta rota em seqüestrar grandes quantidades de cisteína nos lisossomos é evidente a partir da captação da cistina, onde um mínimo de 50-60% da [³⁵S]cistina radioativa total é seqüestrada como cisteína nos lisossomos e essas organelas compreendem só 4% do volume intracelular de fibroblastos humanos normais e 10% nos cistinóticos.

A troca entre cistina e cisteína nos fibroblastos parece ser um processo cíclico, dependente das necessidades do metabolismo celular em ambos os compartimentos: citosólico e lisossomal. A cistina é transportada através da membrana plasmática para o citosol pelo sistema de transporte X_{CG}⁻. Ao entrar no citosol, a cistina é reduzida a cisteína, provavelmente pela GSH. Embora baixos níveis desse último produto tenham sido observados em fibroblastos, a maioria da mistura entre dissulfeto, GSH e cisteína parece ser metabolizada de outra forma, possivelmente por enzimas. A cisteína formada no citosol pode ser transportada de volta ao espaço extracelular onde é reoxidada a cistina.

A cisteína citosólica pode ainda ser utilizada para síntese de GSH, de proteínas, ser metabolizada para a produção de outros constituintes celulares, ou seqüestrada nos lisossomos. Nos lisossomos, a cisteína pode reagir com pontes dissulfeto de proteínas, como sugerido por Lloyd (1986), levando primeiro à formação de quantidades equimolares

de cisteína ligada à proteína e cistina, na posição de cada ponte dissulfeto original e, após a proteólise, liberada como cistina livre e cisteína, no lisossomo. A cistina formada, sai para o citosol pelo sistema de transporte de cistina lisossomal, a cistinosina. No citosol, a cistina é reduzida a cisteína. Nenhuma produção líquida de cistina intralisossomal ocorre via esse mecanismo. Esse modelo esclarece a observação de Thoene e colaboradores (1990), de que fibroblastos cistinóticos acumulam cistina lisossomal pela degradação de proteínas ricas em dissulfeto, mas não pela degradação de proteínas ricas em cisteína.

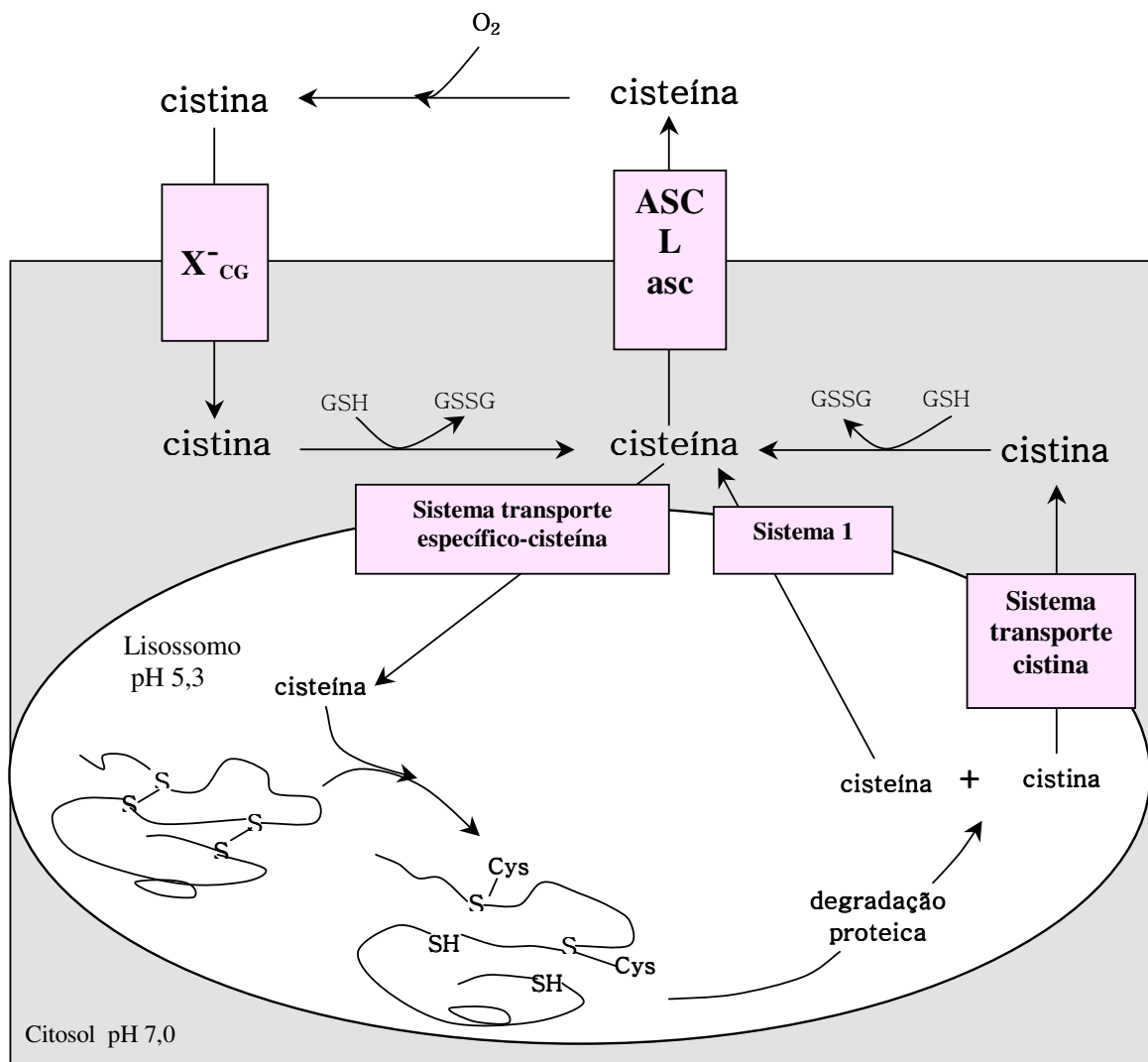


Figura 1: Esquema adaptado do Sistema de Transporte Lisossomal Específico para Cisteína de Pisoni et al, 1990.

2.7 – Características Clínicas

Existem dois fenótipos básicos de cistinose: a nefropática e a não nefropática. A forma nefropática infantil é a mais comum, manifestando-se nos primeiros anos de vida. Nesse trabalho iremos nos referir a cistinose nefropática.

Como é o caso de muitas doenças de depósito lisossomal, as manifestações iniciais da cistinose geralmente aparecem alguns meses após o nascimento. Os sinais e sintomas são multiformes, mas o envolvimento renal é a principal característica clínica da doença.

2.7.1 – Achados Renais

Os sintomas iniciais da cistinose resultam da falência dos túbulos renais em reabsorver pequenas moléculas, causando a *síndrome de Fanconi* em crianças. A cistinose é a causa genética mais comum da síndrome em crianças. A síndrome de Fanconi resulta da perda urinária excessiva de proteínas de baixo peso molecular, glicose, aminoácidos, fosfato, cálcio, bicarbonato, carnitina, água e outras moléculas pequenas. Portanto, os primeiros diagnósticos às crianças cistinóticas podem ser confundidos com outras doenças.

A *poliúria* corresponde a uma perda 2 a 6 litros de urina diluída diariamente, podendo levar à morte. A *desidratação* nessas crianças progride rapidamente e pode ser associada a uma febre crônica. A *fosfatúria* leva ao raquitismo hipofosfatêmico, com dificuldade para caminhar e altos níveis de fosfatase alcalina no soro. A *aminoacidúria generalizada*, resulta da excreção de aminoácidos em concentrações até 10 vezes maiores do que as normais. A concentração de *cistina urinária* é elevada às mesmas extensões dos demais aminoácidos, e os cálculos de cistina não são formados como na cistinúria, por causa da urina diluída e alcalina. Ao iniciar a adolescência, muitos pacientes apresentam nefrocalcinose medular. A proteinúria ocorre porque o epitélio dos túbulos renais é altamente especializado na reabsorção protéica por endocitose (Maunsbach, 1976; van Deurs and Christensen, 1984).

Quando a cistinose é diagnosticada ainda na infância, a concentração de creatinina do soro geralmente não está muito elevada, apesar de um déficit na taxa de filtração glomerular, poder já, ser observada. Muitos pacientes apresentam cilindros granulosos e hematúria ao exame de urina. Na ausência de tratamento, a taxa de filtração glomerular diminui inexoravelmente a partir da infância.

Muitos pacientes têm uma melhora na síndrome de Fanconi. Alguns pacientes têm um inexplicável platô na função renal durante meses ou anos; outros têm uma rápida deterioração iniciada por uma infecção aguda, uma insuficiência renal aguda a partir de uma infecção do trato urinário, glomerulonefrite pós-infecciosa, ou hipoperfusão devido à desidratação.

2.7.2 – Envolvimento Sistêmico antes do Transplante Renal

Pacientes cistinóticos apresentam dimensões normais ao nascer, mas a altura deles cai no primeiro ano de idade e eles conseqüentemente crescem aproximadamente 60% da taxa normal. Na ausência de tratamento essas crianças raramente adquirem uma altura que exceda o percentil 50 para uma criança de 3 anos. Além disso, a formação de cristais de cistina na córnea causa fotofobia na pré-adolescência e o depósito de cristais na tireóide leva ao hipotireidismo antes dos 10 anos de idade. As crianças cistinóticas têm dificuldades para se alimentar, suar, salivar e verter lágrimas. Há deficiência visual e disfunção cognitiva espacial, mas a inteligência geral costuma ser preservada.

2.7.3 – Envolvimento Sistêmico após o Transplante Renal

Após o transplante renal, os pacientes freqüentemente apresentam efeitos colaterais de medicamentos imunossupressores. Entretanto, avanços recentes do uso de altas doses de corticoesteróides de longa duração e medicamentos anti-rejeição podem evitar muitos problemas pós-transplante. Outros pacientes têm complicações debilitantes da própria

doença, incluindo problemas oftalmológicos; uma progressiva miopatia distal com fraqueza muscular; hipogonadismo primário em pacientes do sexo masculino, dificuldade para engolir; disfunção pulmonar; diabete; deterioração do sistema nervoso central e insuficiência exócrica pancreática. O paciente mais velho com cistinose nefropática, o primeiro a se submeter ao transplante (tinha 10 anos em 1968), tem agora 44 anos de idade. Uma mulher cistinótica, teve uma criança saudável e normal após se submeter a um transplante renal bem sucedido (Gahl, et al., 2002).

2.8 – Características Patológicas

O achado predominante na cistinose é a presença de cristais de cistina em quase todas as células e tecidos, incluindo na conjuntiva, córneas, fígado, baço, linfonodos, rins, tireóide, intestinos, mucosa retal, músculos, cérebro, macrófagos e medula óssea. Os cristais são hexagonais, romboédricos ou polimorfos, aumentando na córnea com a progressão da idade. A solubilidade da cistina no plasma, à temperatura de 37 °C e pH 7,3, é 1,7 mM, provavelmente inferior à concentração nos lisossomos dos tecidos. Inexplicavelmente, cristais de cistina nunca foram vistos em cultura de fibroblastos de pacientes com cistinose, apesar da concentração lisossomal de cistina ser 100 vezes maior que os valores normais. Os rins de pacientes cistinóticos têm um estreitamento característico dos túbulos proximais renais, conhecido como deformidade pescoço-de-cisne, que também é vista em outras desordens. Descrita pela primeira vez em 1953, a deformidade desenvolvida no início do curso da cistinose parece corresponder temporariamente ao desenvolvimento da síndrome de Fanconi. Após o início da tubulopatia, crianças com cistinose nefropática apresentam nefrite intersticial crônica, proliferação endotelial nos glomérulos, necrose glomerular e hialinização com espessamento arteriolar e células gigantes multinucleadas, evoluindo em direção à falência

renal. Todas essas alterações morfológicas podem ocorrer na ausência de cristais de cistina visíveis nos rins(Gahl, et al., 2002).

2.9 - Diagnóstico

O diagnóstico é feito por medida do conteúdo de cistina em leucócitos. Os níveis de cistina são medidos com o uso de um ensaio sensível e específico envolvendo proteínas ligadoras de cistina ou com o uso de cromatografia de coluna de troca de íon. Em pessoas normais, uma preparação de leucócitos contém menos do que 0,2 nmol de meia cistina / mg de proteína, enquanto pacientes com cistinose nefropática excedem 2,0 nmol de meia cistina / mg de proteína. (O conteúdo de cistina é expresso em unidades de meia cistina porque os métodos iniciais de quantificação envolveram uma redução de cistina seguida de um ensaio para cisteína). O exame de lâmpada de fenda detecta a presença dos típicos cristais de cistina na córnea, ele é usado no diagnóstico de cistinose, porém esses cristais estão ausentes antes do primeiro ano de vida.

O diagnóstico pré-natal pode ser executado em cultura de amniócitos ou em amostra de vilosidades coriônicas. Muitos pais de filhos que apresentam risco à cistinose evitam detecção pré-natal, mas solicitam testes imediatamente após o nascimento. Assim, o tratamento com cisteamina pode ser iniciado tão logo o diagnóstico confirme a doença. O diagnóstico neonatal pode ser baseado na medida de cistina na placenta ou em leucócitos.

2.10 – Como é o tratamento? E qual é o mecanismo de ação da droga?

Um tratamento bem sucedido para a cistinose nefropática requer um diagnóstico precoce. Se a doença não for identificada e apropriadamente tratada na infância, a falência renal crônica se desenvolve com a concomitante necessidade de diálise e transplante. A necessidade terapêutica de uma criança afetada depende do estágio da doença e cai em 2 categorias: terapia paliativa, e específica.

2.10.1 – Tratamento paliativo

Essa terapia é aplicada em função da enorme perda de fluido e solutos devido à deficiente reabsorção tubular renal. Os rins afetados perdem grande quantidade de água, sódio, cloreto, potássio, bicarbonato, cálcio, aminoácidos, glicose e carnitina. Mecanismos de sede e sensibilidade a sais estão intactos, pois a ingestão de água e de sais é essencial. A reposição de eletrólitos é acompanhada pela administração oral de soluções de bicarbonato de sódio ou de citrato de sódio e potássio, a qual é mais palatável. Também pode ser necessário suplemento de cálcio, fosfato de sódio e vitamina D para prevenir raquitismo renal. A reposição de carnitina eleva os seus baixos níveis plasmáticos, mas alguns estudos apontam a ausência de estudos que comprovem que essa mudança seja acompanhada por uma melhora clínica.

Embora o hormônio de crescimento não esteja deficiente na doença, o seu uso permite um aumento no crescimento para atingir e manter uma estatura normal de acordo com a idade.

O hipotireoidismo, é controlado com levotiroxina e a administração de testosterona pode ser útil para homens com hipogonadismo. Se ocorrer falência renal, os pacientes são tratados com diálise ou hemodiálise até um transplante renal. Os rins transplantados não apresentam alterações funcionais de cistinose, mas podem acumular cistina proveniente do paciente.

2.10.2 – Tratamento Específico

O tratamento específico com **cisteamina** (β -mercaptoetilamina, **CSH**), um aminotiol (Fig. 2), resulta na depleção da cistina lisossomal. Experimentos clínicos demonstraram que a terapia quando iniciada precocemente, retarda a deterioração glomerular renal e permite o desenvolvimento dos pacientes. Muitos pacientes têm sobrevivido até a terceira década de vida sem precisar de um transplante renal. Se o

diagnóstico for feito e o tratamento com cisteamina for iniciado antes do desenvolvimento de sintomas, o prognóstico para a função glomerular é especialmente bom, mas a disfunção tubular ainda ocorre. O uso da terapia previne a reposição de levotiroxina nos pacientes, indicando que ela tem um efeito benéfico ao menos em um órgão não-renal, a tireóide.

Isso sugere que a cisteamina deve ser útil na prevenção de complicações pós-transplante em pacientes com cistinose. O tratamento com cisteamina oral é a melhor escolha para pacientes que tenham cistinose nefropática e não se submeteram ao transplante renal.

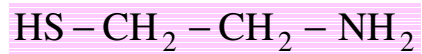


Figura 2 - Estrutura da cisteamina, que depleta a cistina celular.

2.11 – E quando o transporte lisossomal de cistina estiver defeituoso?

A cistinose é definida às vezes como uma doença de depósito lisossomal (LSD), mas a causa primária da cistinose é um problema de transporte da cistina (formada após a proteólise) para o citosol. O sistema da membrana lisossomal para o transporte de cistina (caracterizado extensivamente em leucócitos polimorfonucleares humanos) exibe saturação cinética, contra-transporte, um efeito gene-dependente, estereoespecificidade e um alto grau de especificidade ao ligante. O sistema de transporte de cistina para fora dos lisossomos serve como um protótipo para outros sistemas que transportam aminoácidos, carboidratos e outras moléculas pequenas. Desordens de transporte de ácido siálico e transporte de cobalamina unem-se a cistinose como doenças de defeitos nos transportadores de pequenas moléculas (Gahl et al., 2002)

2.12 – A depleção da cistina pela cisteamina.

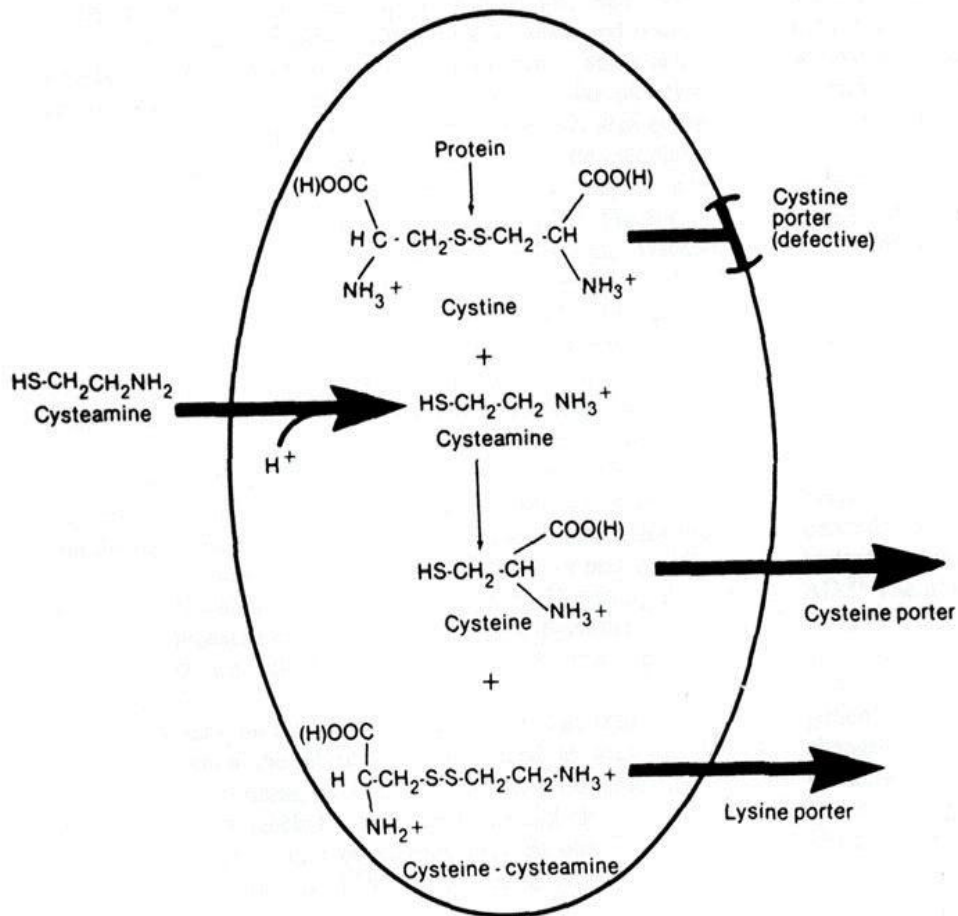


Figura 3 – Depleção da cistina pela cisteamina, fonte: Gahl et al., 2001

A cisteamina entra nos lisossomos através de um transportador específico, reage com cistina e forma cisteína e um dissulfeto cisteamina-cisteína, que sai dos lisossomos por um transportador de lisina. No citosol, os dissulfetos são reduzidos pela gultationa a cisteamina e cisteína. Este processo permite o ciclo da cisteamina entre lisossomos e citoplasma, com cada ciclo removendo 1 mol de meia cistina por mol de cisteamina. A cisteamina tem um odor forte e liga-se à mucosa oral e obturações dentárias. Por essa razão, cápsulas de bitartrato de cisteamina (**Cystagon**, Mylan) são preferíveis

quando as crianças tiverem idade suficiente para engolir as cápsulas. Para bebês, o conteúdo das cápsulas pode ser dissolvido em suco e dado com outros medicamentos.

2.13 - Qual é a dose de cisteamina indicada?

A cisteamina deve ser iniciada com uma dose diária de 10 mg de base livre por quilograma do peso corporal, dada em doses divididas a cada 6 horas e aumentada, a cada semana, em doses de 10 mg / kg por dia, até uma dose máxima de 60 a 90 mg / kg.dia (ou 1,3 a 1,95 g por metro quadrado de área da superfície corporal / dia). As doses mais elevadas podem ser necessárias para obter uma depleção satisfatória de cistina por causa da pobre absorção ou da rápida inativação da droga.

Os efeitos colaterais normalmente estão restritos a náusea e vômito. Em casos raros, pode ocorrer urticária alérgica, convulsões e neutropenia. Aproximadamente 14% dos pacientes não toleram a cisteamina por causa da náusea e vômito. Uma overdose de cisteamina oral pode causar sonolência. Quando administrada em ratas grávidas, em doses muito elevadas, ela causa defeito no desenvolvimento da prole. Os cristais de cistina da córnea não dissolvem com a terapia oral, mas respondem à administração de colírio. Os sintomas oculares regredem em semanas, e as córneas tornam-se límpidas em alguns meses.

Duas organizações oferecem suporte a pacientes com cistinose e aos familiares deles.

2.14 – Relação entre Cistinose e Apoptose

Dados recentes sugerem que a cistina lisossomal aumenta as taxas de apoptose em cultura de células e um processo similar pode ocorrer in vivo. Diferenças nas taxas intrínsecas de apoptose entre pacientes pode ocorrer, em parte, por variações fenotípicas.

3 – CREATINAQUINASE

A creatinaquinase (CK; ATP: creatina *N*-fosforiltransferase, EC 2.7.3.2) foi descoberta em extratos de músculo por Karl Lohman, em 1934. Possui cerca de 400 aminoácidos com massa molecular de 75 a 91 kDa e 306 a 380 kDa, conforme a isoforma. A CK catalisa a transferência reversível de um grupo *N*-fosforil da fosfocreatina (PCr) para o ADP regenerando ATP (fig. 3). Possui papel essencial na homeostasia energética de células com necessidades energéticas variáveis e intermitentes, como por exemplo, músculo esquelético e cardíaco, tecidos neurais como cérebro e retina, fotorreceptores e eletrócitos (Wallimann et al., 1998 a,b). O pH ótimo para a catálise enzimática varia de 6,0 a 7,0 na direção de formação de ATP e 7,5 a 9,0 na direção de formação de PCr.



Figura 4 - Reação catalítica da creatinaquinase

Várias isoformas da creatinaquinase (CK) são identificadas por mobilidade eletroforética, distribuição tecidual e subcelular e sua seqüência primária (Watts, 1973; Villarreal-Levy et al., 1987; Perryman et al., 1986). Há 4 principais isoenzimas da CK e os nomes são em função dos tecidos em que foram historicamente isoladas. Há duas isoformas citosólicas, a muscular (MM-CK) e a cerebral (BB-CK), ambas existindo como homodímeros sob condições fisiológicas, podendo, em algumas circunstâncias, como um heterodímero MB-CK. As isoformas mitocondriais também são duas, a forma ubíqua (Mi_u -CK) e a sarcomérica (Mi_s -CK), as quais são expressas predominantemente no cérebro e no músculo estriado, respectivamente. As isoformas mitocondriais (MtCK), geralmente existem usualmente como octâmeros, mas podem ser transformadas rapidamente em dímeros (McLeish and Kenyon, 2005). A interação entre as isoformas citosólica e

mitocondrial é de fundamental importância na homeostasia energética celular (Silva et al, 2003).

As isoenzimas da CK são conhecidas por conterem o grupamento sulfidrílico no sítio ativo: Cisteína 278 na CK-Mi e Cisteína 283 na CK citosólica (Furter, 1993). Modificações ocorridas nos resíduos sulfidrílicos, por espécies ativas de oxigênio e NO, diminuem a atividade mostrando que este grupamento também tem um importante envolvimento na atividade catalítica da enzima (Suzuki, 1992; Kaneko, 1993).

As isoenzimas da CK citosólica (MM-, MB- e BB-CK) são sempre co-expressadas em tecidos específicos junto com a isoforma mitocondrial. Usando fracionamento bioquímico e localização *in situ*, foi demonstrado que as isoenzimas da CK são estritamente solúveis e de fato compartimentadas subcelularmente e unidas funcional e/ou estruturalmente com sítios de produção de energia (glicólise e mitocôndria) ou consumo de energia (ATPases celulares, como ATPase actinmiosina e ATPase retículo sarcoplasmático), formando um sistema de distribuição de energia altamente regulado e intrincado- o circuito da PCr (Wallimann et al., 1992).

As isoenzimas Mi-CK, localizadas na parte externa da membrana mitocondrial interna, assim como em sítios de contato com a membrana externa e interna, no espaço intermembranas, servem para facilitar, por união funcional com o carreador ATP/ADP (translocador adenina nucleotídeo - ANT). Esta ligação funcional ocorre por meio da exportação eletrogênica da matriz mitocondrial geradora de ATP em troca de ADP através da membrana mitocondrial interna e a transfosforilação do ATP a PCr, conservando a energia livre da hidrólise do ATP exportado pelo ANT. A Mi-CK, por ser funcionalmente unida ao poro da membrana mitocondrial externa, provavelmente esteja envolvida na regulação da importação da creatina pela mitocôndria e exportação da PCr para o citosol. Portanto, através da união cinética das três enzimas ANT, Mi-CK e porina (proteína poro-

mitocondrial), forma-se um importante microcompartimento para o transporte de energia mitocondrial e metabolismo energético celular (fig. 4, Wallimann et al., 1992).

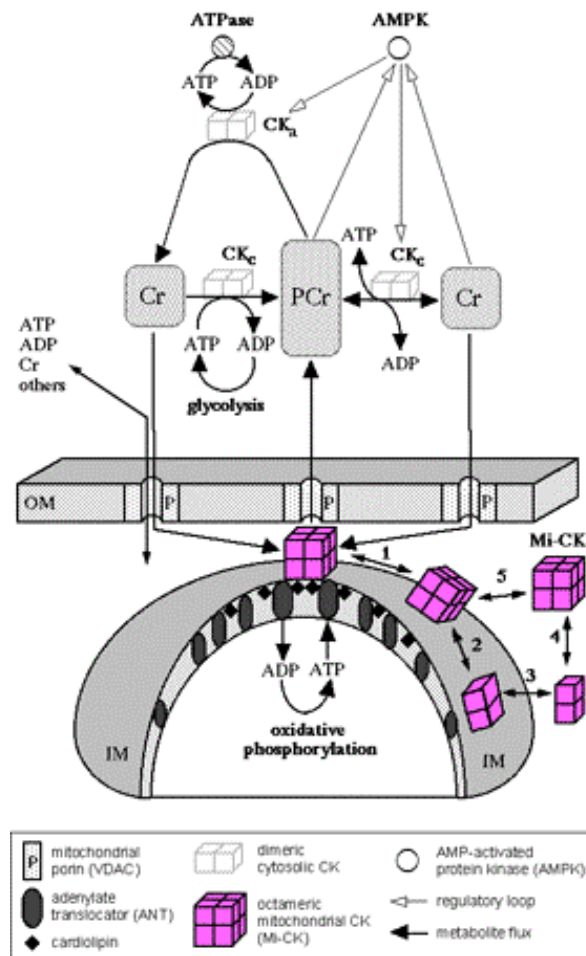


Figura 5 – Circuito da fosfocreatina, fonte: Wallimann et al., 1994

Diferentes funções têm sido sugeridas para a comunicação entre as isoformas de creatinaquinase citosólica e mitocondrial por PCr e Cr (Wallimann, 1994), levando à proposta do modelo de circuito da PCr (Rojo et al., 1991; Wallimann et al., 1992; Wyss et al., 1992). Primeira, o sistema CK/PCr serve como um tampão de energia flutuante, mantendo as concentrações de ATP e ADP estáveis e tamponando os H⁺ gerados. Ao longo do tempo, essa função impede a queda rápida da concentração de ATP durante o trabalho celular e ao mesmo tempo evita uma acidificação intracelular causada pela hidrólise do ATP durante o trabalho. Esse tamponamento de prótons do sistema CK/PCr,

parece especialmente importante na fase inicial do exercício intenso, antes da glicogenólise ser ativada. Além disso, a liberação de fosfato inorgânico (Pi) é outra função metabólica do sistema CK/PCr (Meyer et al., 1984).

Segunda, o circuito PCr serve para melhorar a eficiência termodinâmica da hidrólise do ATP para manter baixa a concentração de ADP e manter alta a razão ATP/ADP nos sítios subcelulares onde a CK está funcionalmente associada aos processos que requeiram ATP, como por exemplo, bombas de íons (Wallimann et al., 1994).

Terceira, o circuito PCr também serve como tampão de energia transportada entre compartimentos. Nesse papel, a PCr tem a função de transportadora de energia, conectando sítios de produção de energia, como fosforilação oxidativa mitocondrial, com sítios de utilização de energia, onde a CK mitocondrial tem um papel eminente. Essa função da CK é sustentada por compartimentalização subcelular específica de diferentes isoenzimas da CK em uma variedade de tecidos, como músculos, eletrócitos, células fotorreceptoras e espermatozóides, por compartimentalização subcelular da PCr/Cr, ATP/ADP e Pi e pela localização, estrutura e propriedades funcionais da Mi-CK octamérica (Saks et al., 1984; Gellerich et al., 1987; Savabi et al., 1988; Saks et al., 1991; Zeleznikar et al., 1991; Wallimann et al., 1992).

A localização subcelular e proporções relativas das isoenzimas da CK, assim como os níveis da PCr em diferentes tecidos de demanda energética alta e intermitente, sugerem que o sistema CK/PCr trabalha não somente em paralelo com a difusão de ATP e ADP, mas dependendo do tecido, também funciona como um elo obrigatório entre sítios de produção e consumo de ATP (Wallimann et al., 1992).

O circuito CK/PCr parece cumprir todas as necessidades de um sistema altamente organizado de transporte e tamponamento de energia, assim como um sistema regulatório para controle das razões subcelulares de ATP/ADP, levando juntos a uma utilização de energia mais eficiente em termos termodinâmicos. Dependendo das necessidades

metabólicas da célula ou tecido, uma dessas diferentes funções do circuito CK/PCr pode estar dominante. Por exemplo, em fibras musculares glicolíticas de contração rápida, a função de tamponamento pode ser mais proeminente do que a função de transporte. Já na contração lenta, ou no músculo cardíaco, assim como em espermatozóides ou células fotorreceptoras, a função de transporte pode ter maior relevância do que a função de tamponamento. O circuito CK/PCr representa uma rede de distribuição de energia conectando sítios intracelulares de produção de ATP (mitocôndria e glicólise) com sítios de consumo de ATP (ATPases) (Wallimann et al., 1992).

A CK parece estar envolvida em certas condições patológicas relacionadas com déficit de energia cerebral. Em condições anóxicas, a adição de creatina ao meio de incubação contendo fatias de cérebro protege a transmissão sináptica e mantém o potencial de ação via Na^+ , K^+ -ATPase (Whittingham e Lipton, 1981); a adição de creatina aumenta os níveis de PCr reduzindo a queda de ATP, a liberação de Ca^{+2} e a morte celular (Carter et al., 1995). A deficiência congênita de creatina cerebral está associada à disfunção extrapiramidal, convulsões e fraqueza muscular (Stöckler et al., 1994).

Quantidades significativas da atividade da Mi-CK e de seu mRNA também foram observadas nos rins, onde a Mi-CK junto com a BB-CK, foi encontrada no córtex e medula externa renal, provavelmente participando do transporte de sódio. O mRNA para a Mi-CK ubíqua foi a principal forma encontrada nos rins, placenta, intestino e cérebro (Wallimann et al., 1992).

Devido à necessidade de energia para a manutenção do desenvolvimento e regulação das funções cerebrais, tem sido postulado que o prejuízo na função da CK pode ser um importante passo no processo neurodegenerativo que leva à perda neuronal no cérebro (Tomimoto et al., 1993). De fato, a atividade da CK está severamente reduzida em várias doenças neurodegenerativas (David et al., 1998; Aksenov et al., 2000).

A CK é altamente sensível a espécies reativas do oxigênio (ROS) (Stachowiak et al., 1998; Kaneko et al., 1993 e Gross et al, 1996). Este efeito produz deficiência energética, acúmulo de ADP e excesso de cálcio intracelular. Foi verificado que o peroxinitrito afeta a forma octamérica da Mi-CK e evita a reoctamerização da forma dimérica (Gross et al, 1996, Wendt et al.,1998). Acredita-se que a desestabilização da energia celular por exposição crônica a espécies reativas de oxigênio pode ocorrer em muitas doenças neuromusculares, com elevação dos níveis de Ca^{2+} intracelular e apoptose (Mattson,1992). Foi demonstrada uma clara ligação entre o aumento das formas diméricas, o aumento de Ca^{2+} e doenças cardíacas (Soboll et al.,1999).

4 – Piruvatoquinase

Uma vez que a via glicolítica é um sistema fundamental para o metabolismo energético nos organismos, as enzimas glicolíticas estão presentes em todas as células ou tecidos dos mamíferos. Entretanto, cada tipo de tecido utiliza essas enzimas de uma maneira específica para seu metabolismo. Por exemplo, o fígado, predominantemente converte piruvato, um produto glicolítico, em ácidos graxos via acetil-CoA, enquanto a glicose é metabolizada a lactato ou CO_2 e água, para produção energética no músculo e no cérebro.

A piruvatoquinase (PK; ATP:piruvato 2-*O*-fosfotransferase, EC 2.7.1.40) existe em múltiplas formas (isoenzimas). Geralmente essas isoenzimas são expressas de forma específica em cada tecido e com propriedades químicas, físicas, cinéticas, eletroforéticas e imunológicas distintas. A PK é uma das enzimas que regulam a velocidade da via glicolítica, catalisando a formação de piruvato e ATP a partir de fosfoenolpiruvato e ADP, como demonstrado pela equação abaixo:

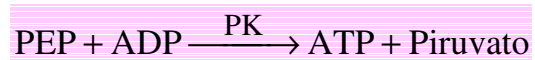


Figura 6 - Reação catalítica da piruvatoquinase

Nos mamíferos, a PK existe na forma de 4 isoenzimas, que são referidas como tipo L-, R-, M₁-, e M₂- (Imamura et al., 1986).

A **L-PK** é predominantemente expressada em tecidos gliconeogênicos, especialmente no fígado, onde se constitui no maior componente, no rim, onde é o menor componente (Harkins et al, 1977; Staal et al., 1985), estando também presente no intestino delgado e nas células do pâncreas(1,2). A isoforma **R-PK** é expressa nos eritrócitos e tecidos hematopoiéticos. A **M₁-PK** é expressa em músculo esquelético, coração e cérebro adulto, constituindo-se na principal isoenzima nos tecidos diferenciados. A **M₂-PK** é predominante no feto, em neoplasias e nos tecidos indiferenciados e em proliferação, embora seja encontrada também em alguns tecidos adultos, em menor quantidade no fígado e em maior quantidade no rim (Dabrowska et al., 1998). As expressões dessas isoenzimas são reguladas durante o desenvolvimento. A M₂-PK é a única detectável precocemente em tecido fetal, sendo gradualmente substituída pelos tipos L-, R-, M₁-, durante o desenvolvimento. Em contraste, em células transformadas e na regeneração do fígado, as isoenzimas tecido-específicas estão presentes em níveis diminuídos ou completamente ausentes e são substituídas pela isoenzima M₂-PK.

Todas as PKs são enzimas citosólicas e homo-tetraméricas e cada subunidade (monômero) consiste de 4 domínios (A, B, C e N), cada um possuindo um sítio ativo. As PKs de mamíferos exibem propriedades alostéricas, sendo ativadas homotropicamente pelo fosfoenolpiruvato e heterotropicamente pela frutose 1,6-bisfosfato (FBP) para formar piruvato, o qual está envolvido em uma variedade de rotas metabólicas, indicando que a PK pode ser considerada uma enzima chave não somente para a rota glicolítica, mas também para o metabolismo celular (Mattevi et al., 1996).

A isoenzima M₁-PK, por muito tempo foi considerada diferente das outras formas em suas propriedades enzimáticas, não sendo regulada alostéricamente, mostrando cinética hiperbólica e não sendo ativada pela frutose-1,6-bisfosfato (FBP). A isoenzima M₂-PK

mostra uma cinética sigmoidal para o fosfoenolpiruvato (PEP) e é ativada pela FBP (Friesen et al., 1998).

5 - Estresse Oxidativo

O texto sobre estresse oxidativo foi retirado das seguintes fontes:

- Locatelli et al., 2003; Carvalho et al., 2003; - e outras fontes citadas.

5.1 – O que é Estresse Oxidativo?

O estresse oxidativo é definido como um dano tecidual resultante de um desequilíbrio entre uma produção excessiva de compostos oxidantes e mecanismos de defesas antioxidantes ineficientes.

A produção de compostos oxidantes é fisiologicamente relevante como uma etapa importante nos processos de inflamação e reparo tecidual. Além disso, eles representam uma parte dos mecanismos de defesa contra a invasão de microorganismos e células malignas, bem como do restabelecimento e remodelagem tecidual. Por outro lado, uma ativação imprópria ou inadequada dos processos oxidativos pode estar presente cronicamente em situações patológicas, contribuindo para a injúria celular e tecidual.

5.2 – Radicais Livres e Espécies Reativas: Os Oxidantes!

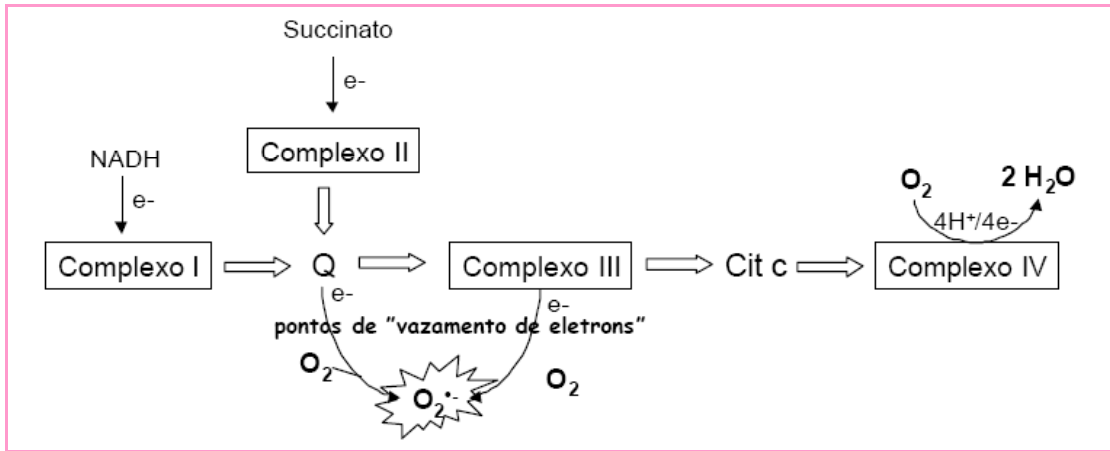
O papel patogênico dos radicais livres do oxigênio nas doenças foi reconhecido, pela primeira vez, por Harman em 1956, que hipotetizou que eles eram gerados *in vivo*, onde exerciam um papel na injúria celular, no câncer e nos processos do envelhecimento (Harman, 1956; Harman, 1981).

Do ponto de vista químico, um radical livre (RL) é definido como qualquer átomo, grupo de átomos ou molécula capaz de existir sob forma independente, que contenha um ou mais elétrons desemparelhados (Del Maestro, 1980; Southorn, P. A. & Powis, G., 1988; Halliwell & Gutteridge, 1999). Portanto, os RL podem ser formados pela adição ou pela perda de um elétron ou de uma substância não-radicalar. Entretanto, há compostos tão reativos quanto os RL, mas que não possuem elétron não-pareado na última camada. Sendo assim, não podem ser denominados radicais livres (Dröge, 2002). Essas substâncias são classificadas de forma mais abrangente como **Espécies Reativas do Oxigênio (ROS = Reactive Oxygen Species)** e **Espécies Reativas do Nitrogênio (RNS = Reactive Nitrogen Species)**.

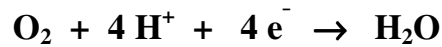
As ROS, geralmente têm uma meia-vida curta e sua recombinação química é quase imediata. Estudos mostram que as ROS têm uma forte tendência para estabilizar sua órbita, captando um elétron de outro átomo ou molécula, que passa a tornar-se uma substância radicalar.

5.3 - Fontes Oxidativas

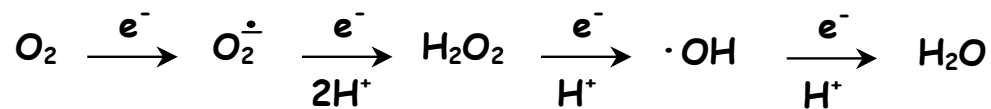
De maneira geral, o oxigênio molecular (O_2) é necessário para a sobrevivência de todos organismos aeróbicos. Assim, a obtenção de energia por estes organismos é feita através da fosforilação oxidativa. A cadeia respiratória mitocondrial representa a fonte celular mais potente de oxidantes, sendo seu principal sítio de formação o complexo ubiquinona-citocromo *c* (Tyler, 1975), exemplificado pelo esquema abaixo:



Na mitocôndria a citocromo oxidase promove a redução completa de uma molécula de O_2 em uma de H_2O , onde são necessários 4 elétrons:



Porém, nem sempre o oxigênio se transforma completamente em água. Como consequência de sua configuração eletrônica, a molécula de oxigênio tem forte tendência, durante as reações, em receber um elétron de cada vez, formando uma série de intermediários tóxicos e reativos (Meneghini, 1987). Neste processo são formados os intermediários: ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\cdot OH$), que correspondem à redução por um, dois e três elétrons, respectivamente, conforme esquema abaixo:



Os oxidantes mitocondriais podem exercer efeitos danosos e contribuem para o envelhecimento celular e doenças neurodegenerativas. Entretanto, até agora, não havia métodos disponíveis para determinar a contribuição dos oxidantes para a patologia celular.

O sistema de geração oxidante dos fagócitos é baseado na produção das ROS via a redução do oxigênio molecular (O_2). Após a exposição a estímulos apropriados, a ativação de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) e de macrófagos e monócitos aumenta o consumo de O_2 . O sistema da enzima NADPH-oxidase, o qual está ligado a membranas celulares, reduz o O_2 ao radical ânion superóxido, que é altamente instável, sendo imediatamente convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Ambos, $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , são precursores de outros potentes oxidantes. O $O_2^{\cdot-}$ interage com óxido nítrico (NO) para formar as RNS, enquanto o H_2O_2 reage com o ferro intracelular e forma o radical hidroxil ($\cdot OH$), o qual está estritamente envolvido na degradação lipídica da membrana celular, à agregação protéica e dano ao DNA. Além disso, o H_2O_2 é substrato para a mieloperoxidase (MPO) para produzir oxidantes clorados. Na presença de íons cloreto (Cl^-), a MPO converte H_2O_2 a ácido hipocloroso (OCl^-), um potente composto capaz de oxidar lipídeos, proteoglicanos, e grupos tiólicos de proteínas de membrana. Além disso, também pode reagir com aminas ($R-NH_2$) endógenas para produzir cloraminas ($RNH-Cl$).

As ROS são liberadas juntamente com as citocinas pró-inflamatórias, as quais amplificam a geração de oxidantes.

Tabela 1 – Exemplos de algumas ROS e RNS

| Nome | Fórmula | Comentários |
|---------------------------------|-----------------|---|
| Radical ânion superóxido | $O_2^{\cdot -}$ | É formado pela redução do oxigênio por 1 elétron. Produzido por células fagocíticas onde tem papel importante na inativação de vírus e bactérias. Também é produzido durante o metabolismo normal da mitocôndria. |
| Radical Hidroxila | $\cdot OH$ | É um dos radicais livres mais potentes, sendo produzido pela ação de radiações ionizantes e na decomposição de H_2O_2 catalisada por metais. |
| Peróxido de hidrogênio | H_2O_2 | É formado na dismutação do radical ânion superóxido catalisada pela SOD. Também é produzido por várias oxidases, entre elas a xantina oxidase. |
| Ácido hipocloroso | $HOCl$ | É produzido a partir de Cl^- e H_2O_2 pela mieloperoxidase em neutrófilos ativados. Possui importante papel na destruição de bactérias. Reage com H_2O_2 produzindo 1O_2 . |
| Oxigênio singlete | 1O_2 | É uma forma bastante reativa do oxigênio. É produzido nas reações de fotossensibilização e em outras reações envolvendo peróxidos. |
| Óxido nítrico | $\cdot NO$ | É um radical com importantes papéis fisiológicos, sendo formado a partir da L-arginina numa reação mediada por enzimas do grupo da NO sintase. |
| Peroxinitrito | $ONOO^-$ | Formado na reação entre $O_2^{\cdot -}$ e $\cdot NO$. Sua protonação torna-o altamente oxidante sendo capaz de lesar uma série de biomoléculas. |

5.4 - Marcadores do Estresse Oxidativo

Os oxidantes são compostos altamente reativos, com uma meia-vida de segundos. Além disso, a determinação deles *in vivo*, geralmente, não é possível. Ao contrário, lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, após serem modificados por oxidantes, têm uma meia-vida que varia de horas a semanas, o que faz deles marcadores ideais do estresse oxidativo.

Os radicais livres podem atacar uma série de biomoléculas, iniciando reações em cascata onde um radical reage com um composto gerando novos radicais. O alvo celular dos radicais (proteínas, lipídeos e DNA) está relacionado ao seu sítio de formação. O processo de oxidação resultante do ataque de radicais livres sobre a membrana chama-se **lipoperoxidação**. A lipoperoxidação é dividida em 3 etapas, iniciação, propagação, e terminação. Na etapa de:

- 1 - *iniciação*, o radical livre ataca a cadeia do ácido graxo (LH) abstraindo um hidrogênio, gerando um radical centrado no carbono da cadeia alifática do lipídeo (L•).
- 2 - *propagação*, o L• reage rapidamente com o oxigênio formando radicais peroxila (LOO•), esses, por sua vez, atacam outros ácidos graxos adjacentes gerando mais L•, gerando assim uma reação em cadeia.
- 3 - *terminação* é resultante da reação entre os radicais formando compostos não radicalares (fig. 7).

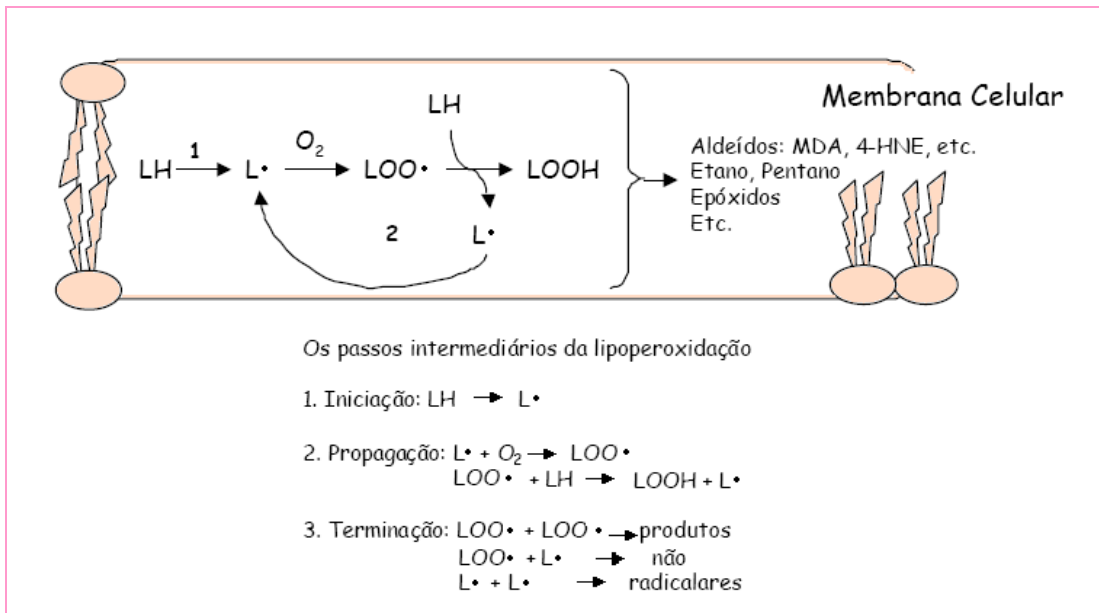


Figura 7 – Representação das etapas da lipoperoxidação

Durante a peroxidação lípidica, hidroperóxidos instáveis, resultantes de uma cascata de reações dependentes do radical peroxil com ácidos graxos insaturados, são degradados a produtos menores e mais estáveis como a acroleína, malonaldeído ou malondialdeído (MDA), 4-hidroxinonenal (HNE), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Como resultado da lipoperoxidação as membranas sofrem alterações na fluidez e na permeabilidade, resultando em perda na homeostasia e morte celular.

Proteínas são alvos da injúria mediada por oxidantes, como as ligações cruzadas e os produtos de agregação, os quais podem ser resistentes à proteólise. Entretanto, tem sido difícil encontrar marcadores da oxidação protéica. Produtos de oxidação protéica (AOPPs) foram encontradas em pacientes com insuficiência renal. A denominação AOPPs é usada em analogia com os produtos finais de glicação, ou “advanced glycation end-products” (AGEs), com os quais, os AOPPs têm várias homologias. A existência de uma forte relação entre AOPPs e AGEs levou ao conceito de carbonilas de estresse, onde a oxidação atua junto com a glicação na formação das AGEs.

Finalmente, os compostos oxidativos podem interagir com ácidos nucleicos e contribuir para a mutagênese e oncogênese.

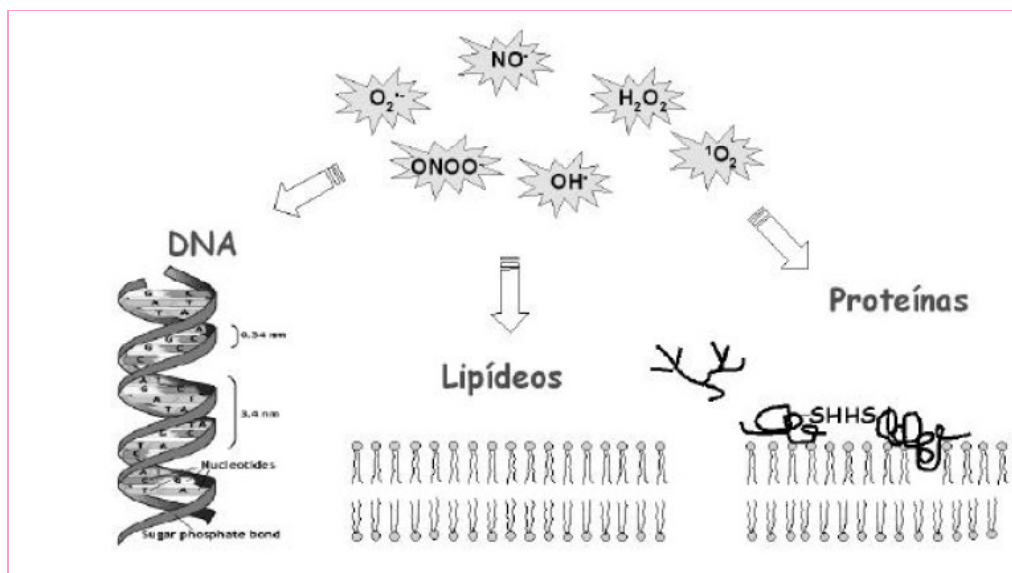


Figura 8 – Principais alvos das substâncias oxidantes

5.5 - Sistemas de Defesa Antioxidantes

Para prevenir os efeitos nocivos das ROS, sistemas antioxidantes: enzimáticos e não-enzimáticos, estão naturalmente presentes e neutralizam os radicais livres. A superóxido dismutase (SOD) acelera a taxa de dismutação do $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 como a primeira linha da defesa antioxidante. A catalase (CAT) reduz H_2O_2 a água. A glutathiona peroxidase contendo selênio (GPx) reduz todos os peróxidos lipídicos orgânicos e requer GSH como um doador de hidrogênio (Tabela 3).

O principal antioxidante não-enzimático ativo é representado pela própria GSH (tabela 2), a qual atua como um “scavenger” de H_2O_2 , $\cdot OH$ e oxidantes clorados. A vitamina E protege a membrana celular da peroxidação lipídica pela formação de um radical tocoferoxil de baixa reatividade. A vitamina C age como “scavenger” diretamente de $O_2^{\cdot-}$ e $\cdot OH$. Proteínas plasmáticas como ferritina, transferrina e mesmo albumina exercem um efeito antioxidante não-enzimático pelo seqüestramento de íons de metal de transição.

Tabela 2 - Exemplo de antioxidante não-enzimático

| | | |
|------------------------------|--|--|
| Glutathiona (GSH) | Tripeptídeo presente em altas concentrações nas células; | Reduz peróxidos (H_2O_2 , LOOH) a água ou álcool numa reação catalisada pela GPx. |
| | Exerce papel fundamental no funcionamento da GPx. | Capaz de neutralizar radicais $O_2^{\cdot-}$ e $\cdot OH$. Reduz dehidroascorbato a ascorbato. |

Tabela 3 – Principais antioxidantes enzimáticos

| Enzima Antioxidante | Propriedades | Localização/ Tipos |
|-----------------------------|---|--|
| SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) | Transforma o radical superóxido em H_2O_2 | <u>Citoplasma</u> : Cu, Zn-SOD |
| | $O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$ | <u>Matriz Mitocondrial</u> : Mn-SOD <u>Extracelular</u> : a SOD contem Cu e Zn no sítio catalítico. |
| GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx) | Remove H_2O_2 e outros peróxidos orgânicos $H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow 2 H_2O + GSSG$ $LOOH + 2GSH \rightarrow LOH + H_2O + GSSH$ Onde L=H | c-GPX: GPx clássica PHGPX: GPx específica para hidroperóxidos de fosfolipídio p-GPX: GPx <u>plasmática</u> GI-GPX: GPx <u>encontrada principalmente no trato digestivo</u> . *todas possuem Selênio no sítio ativo |
| CATALASE (CAT) | Remove o H_2O_2 $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$ | <u>Abundante no Fígado e Eritrócitos</u> : Heme-Catalase. Mn-Catalase. |

A geração excessiva de metabólitos reativos do oxigênio também exerce um papel na fisiopatologia de uma variedade de doenças renais, clínicas e experimentais (Ichikawa et al., 1993). Essas doenças incluem desordens glomerular e tubular, crônica e aguda, por meio de ambos os mecanismos: imunológicos e não-imunológicos. Nos rins, como em outros órgãos, as enzimas antioxidantes endógenas protegem as células contra os efeitos tóxicos dos radicais livres e tem um sistema de defesa especial contra a injúria oxidativa. A SOD existe em 2 formas: Cu,Zn-SOD e Mn-SOD. Estudos indicaram que a atividade das SODs e CAT é modulada por muitos estímulos e é regulada para satisfazer a necessidade biológica imposta pelo estresse oxidante (Touati, 1992).

II – OBJETIVOS

Considerando que os mecanismos bioquímicos envolvidos na gênese do dano celular e tecidual presente na cistinose são pouco conhecidos e controversos, esse trabalho teve como objetivos:

1 - Determinar os efeitos *in vitro* e *in vivo* da cistina e/ou da cisteamina sobre a atividade da creatinaquinase, em frações mitocondrial e citosólica de rim de ratos Wistar jovens, e caracterizar o tipo de inibição causada pela cistina.

2 - Investigar o efeito da administração do dimetil cistina éster e/ou cisteamina sobre as atividades da piruvatoquinase em homogeneizado livre de mitocôndrias e da creatinaquinase nas frações mitocondrial e citosólica de rim e de cérebro de ratos Wistar jovens.

3 - Determinar o efeito da administração do dimetil cistina éster e/ou cisteamina sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em rim de ratos Wistar jovens.

III - RESULTADOS

Objetivo 1 - Determinar os efeitos in vitro e in vivo da cistina e/ou da cisteamina sobre a atividade da creatinaquinase, em frações mitocondrial e citosólica de rim de ratos Wistar jovens, e caracterizar o tipo de inibição causada pela cistina

Artigo 1

Inibição da atividade da creatinaquinase por cistina no rim de ratos jovens

Virginia Cielo Rech, Genaro Azambuja Athaydes, Luciane Rosa Feksa, Paula Karine Barcelos Dornelles, Valnes Rodrigues-Junior, Carlos Severo Dutra-Filho, Angela Terezinha de Souza Wyse, Moacir Wajner, and Clovis Milton Duval Wannmacher. Inhibition of creatine kinase activity by cystine in the kidney of young rats. *Pediatric Research*, 60:190-195, 2006.

Inhibition of creatine kinase activity by cystine in the kidney of young rats

Virginia Cielo Rech, Genaro Azambuja Athaydes, Luciane Rosa Feksa, Paula Karine Barcelos Dornelles, Valnes Rodrigues-Junior, Carlos Severo Dutra-Filho, Angela Terezinha de Souza Wyse, Moacir Wajner, and Clovis Milton Duval Wannmacher

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2600, CEP 90.035-003, RS, Brazil

Running title: *Cystine inhibits renal creatine kinase*

Corresponding author: Clovis M. D. Wannmacher

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600, CEP 90.035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

Fax 55 51 33165535, E-mail. clovisdw@ufrgs.br

Abstract

Nephropathic cystinosis is a lethal genetic disease caused by a lysosomal transport disorder leading to intra-lysosomal cystine accumulation in all tissues. Cystinosis is the most common inherited cause of Fanconi syndrome, but the mechanisms by which cystine causes tissue damage are not fully understood. Thiol-containing enzymes are critical for renal energy metabolism and may be altered by disulfides like cystine. Therefore, in the present study our main objective was to investigate the *in vivo* and *in vitro* effects of cystine on creatine kinase, which contains critical thiol groups in its structure, in the kidney of young Wistar rats. We observed that cystine inhibited *in vivo* and *in vitro* the enzyme activity and that this inhibition was prevented by cysteamine and glutathione. The results suggest oxidation of essential sulfhydryl groups necessary for creatine kinase function by cystine. Considering that creatine kinase and other thiol-containing enzymes are crucial for renal energy metabolism, and programmed cell death occurs in situations of energy deficiency, the enzyme inhibition caused by cystine released from lysosomes might be a mechanism of tissue damage in patients with cystinosis.

Key words: cystine; kidney; creatine kinase; cysteamine; cystinosis.

Abbreviations

CK; creatine kinase

CSH: cysteamine

Cys: cystine

GSH: reduced glutathione

K_i: inhibition constant

K_m: Michaelis-Menten constant

Introduction

Nephropathic cystinosis is an autosomal recessive disease characterized by a defect in the transport of cystine out of lysosomes, leading to intralysosomal accumulation of cystine in most body tissues (1). It is caused by lack of expression of the gene encoding cystinosin, the lysosomal membrane cystine transporter (2). Cystine accumulation leads to renal failure and other systemic complications in non-treated cystinotic children (3). Cysteamine (CSH) treatment, when initiated in the first 2 years of age, reduces the intracellular concentrations of cystine, delaying the evolution towards end stage renal disease (4). The first clinical symptoms occurring in early childhood are severe electrolyte disturbances, urinary loss of solutes and failure to thrive, and are thought to be due to the Fanconi syndrome (5). Histopathological studies showed evidence of a temporal relationship between cellular cystine accumulation, the development of the characteristic “swan neck” lesion of the proximal tubule and the Fanconi syndrome (6). Lysosomal localization of cystinosin in human proximal tubular cell supported its defect in cystinosis (7).

It is well known that some enzyme activities may be altered by thiol/disulfide exchange between protein sulfhydryl groups and biologically occurring disulfides (8). Creatine kinase (CK, EC 2.7.3.2) is a thiol-containing enzyme that catalyses the reversible transfer of the phosphoryl group from phosphocreatine to ADP, regenerating ATP. This enzyme exerts a key role in cellular energy metabolism of tissues with high-energy requirements (9). There are distinct CK isoenzymes, which are compartmentalized specifically in places where energy is released (mitochondria) or utilized (cytosol). The kidney contains BB-CK (cytosolic isoform) and ubiquitous Mi-CK (mitochondrial isoform). These isoforms are present in the renal cortex and outer medulla, possibly supplying energy necessary for sodium transport in the nephron (10). Sodium-dependent transporters were shown to be

inhibited in immortalized human kidney epithelial cells loaded with cystine dimethyl ester (11), suggesting a possible involvement of CK activity. One of the factors that enable cells to undergo apoptosis, or other form of programmed cell death, is an alteration of mitochondrial permeability with consequent reduction of ATP supply (12). In this context, we have recently reported that cystine inhibits CK activity *in vitro* in the brain of young rats (13).

On the other hand, considering that cystine is a disulfide, it is feasible that it may act on intracellular thiol-enzymes, like CK, modifying cell function and contributing to cell death. Therefore, in the present study we investigated the *in vivo* and *in vitro* effects of cystine on CK activity in mitochondrial and cytosolic fractions of rat kidney. We also investigated the effects of cysteamine and reduced glutathione (GSH), a thiol-containing peptide, on the inhibition caused by cystine on the enzyme activity.

Methods

Animals and reagents

Sixty 21-day-old Wistar rats bred in the Department of Biochemistry, UFRGS, were used in the experiments. At this age, Wistar rat development is equivalent to the development of a 6-years-old child. The animals were kept with dams until they were sacrificed. The dams had free access to water and to a standard commercial chow (Supra, Porto Alegre, RS, Brazil) containing 20.5% protein (predominantly soybean supplemented with methionine), 54% carbohydrate, 4.5% fiber, 4% lipids, 7% ash and 10% moisture. Temperature was maintained at 24 ± 1 °C, with a 12-12 h light-dark cycle. The “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication 85-23, revised 1985) were followed in all the experiments, and the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Rio Grande do Sul approved the experimental protocol. All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

In vivo experiments

Twenty four animals were randomly separated into four groups and received administration of 20 $\mu\text{L/g}$ body weight of one of the following buffered solutions (pH 7.4): 0.85 g% saline (control group), 50 mM cystine (Cys group), 13 mM cysteamine (CSH group), or 50 mM cystine + 13 mM cysteamine (Cys + CSH group). Cysteamine was administered subcutaneously and saline or cystine was administered intraperitoneally. Cystine dose was chosen to achieve 0.5 mM concentration in kidney tissue after 60 min (controls < 0.2 mM); cysteamine dose was similar to that used to treat patients affected by cystinosis (1). Rats were killed after one hour and the kidneys removed for cystine and CK activity determination.

Preparation of renal tissue

Treated and non-treated animals were killed by decapitation, the kidneys were rapidly removed, decapsulated, washed and homogenized with a Teflon-glass homogenizer in 5 volumes of ice-cold SET buffer (0.32 M sucrose, 1 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl), pH 7.4. The homogenate was centrifuged at 800 x g for 10 min, the pellet was discarded and the supernatant was centrifuged at 10,000 x g for 15 min. The supernatant solution of the second centrifugation, containing the cytosol and other cellular components such as endoplasmic reticulum and lysosomes, was collected for determination of the cytosolic CK activity. The pellet, containing mitochondria, was washed twice with the same isotonic SET buffer, resuspended in 100 mM MgSO_4 -Trizma buffer, pH 7.5, for determination of the mitochondrial CK activity. The cytosolic and mitochondrial fractions were stored for no more than 1 week at $-70\text{ }^\circ\text{C}$ in case the enzymatic assay was not carried out immediately after the subcellular preparations. The mitochondrial fraction was frozen and

thawed three times immediately before the assay to break mitochondrial membranes, facilitating the interaction between CK and the substrates.

Cystine determination

The cystine content in kidney tissue was measured according to Sullivan et al (15) using cystine as the standard. Briefly, proteins were removed from kidney homogenate with 5% TCA (trichloroacetic acid). Fifty μL of the supernatant were mixed with 20 μL of 1mM sodium cyanide to liberate cysteine from cystine. After 10 min, 10 μL of 40 mM sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate, 50 μL of 0.8 M sodium sulfite, and 10 μL of 0.25 M sodium hyposulfite were added. The absorbance was measured in a spectrophotometer at 530 nm. The content of cysteine and other thiols was measured by the same method, using water instead of cyanide. The difference between the two measures was considered as cystine.

Creatine kinase activity assay

The reaction mixture contained the following final concentrations: 300 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 7 mM phosphocreatine, 9 mM MgSO_4 , and approximately 1 μg protein in a final volume of 0.13 mL. After a variable time of preincubation at 37 °C (0, 30 or 60 min), the enzymatic reaction was started by the addition of 0.42 μmol ADP. In the experiments performed to test the influence of GSH and CSH on the inhibition caused by cystine, 1 mM GSH or 2 mM CSH were added before (to evaluate prevention) or after (to evaluate reversion) preincubation of the enzymatic material (cytosolic or mitochondrial fraction) for 0, 30 and 60 min in the presence of cystine. The reaction was stopped after 10 min incubation by the addition of 1 μmol p-hydroxymercuribenzoic acid. The reagent concentrations and the incubation time were chosen to assure linearity of the enzymatic

reaction. Appropriate controls were carried out to discount chemical hydrolysis of phosphocreatine and the amount of creatine already present in the enzymatic material. The creatine formed by the enzymatic action was estimated according to the colorimetric method of Hughes (16). The color was developed by the addition of 0.1 mL 2 % α -naphthol and 0.1 mL 0.05 % diacetyl in a final volume of 1 mL and read after 20 minutes at 540 nm. None of the substances added to the assay medium interfered with the color development or spectrophotometric readings. Results were expressed as nmol of creatine formed per min per mg protein.

For the *in vivo* experiments, CK activity was measured in the absence and in the presence of 1 mM reduced glutathione (GSH), the most abundant thiol-containing peptide of the kidney, which achieves 5 mM concentration in both mitochondria and cytosol of the renal tubular cells (17).

The *in vitro* experiments were performed in the following sequence:

- 1- Cystine was added to the incubation medium at 0.2, 0.5 and 1.0 mM final concentrations without preincubation (0 min) or preincubated for 30 or 60 min;
- 2- Cystine was added to the incubation medium at 0.5 mM final concentration and preincubated for 0, 30 or 60 min; 1 mM reduced glutathione (GSH) was added before preincubation or after 30 or 60 min of preincubation;
- 3- Cystine was added to the incubation medium at 0.5 mM final concentration and preincubated for 0, 30, and 60 min; 2 mM cysteamine was added before preincubation or after 30 or 60 min of preincubation;
- 4- Competition studies between cystine and the enzyme substrates phosphocreatine or adenosine-5'-diphosphate (ADP) and the determination of the Michaelis-Menten constant (K_m) was performed according to Lineweaver and Burk (18). In these experiments, phosphocreatine or ADP concentrations were chosen to assure linearity of creatine kinase

activity and cystine inhibition. The values of the inhibition constant (K_i) were determined according to Dixon and Webb (19).

Protein determination

The protein content was determined by the method of Lowry et al. (14) using bovine serum albumin as the standard.

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Tukey test when the F values were significant. Concentration or time dependent effects were analyzed by linear regression. All data were analyzed by the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software using a PC computer.

Results

First, the animals were subjected to administration of cystine, cysteamine, or cystine plus cysteamine. Creatine kinase activity was then measured in the presence and in the absence of GSH in the assay. When measured in the absence of GSH, cystine administration reduced CK activity in the mitochondrial ($F(3,16)= 3.56$; $p < 0.05$) and cytosolic ($F(3,20)= 7.91$; $p < 0.001$) fractions. Furthermore, cysteamine administration did not alter CK activity, but prevented the enzymatic inhibition caused by cystine. When CK activity was measured in the presence of GSH, we did not observe differences between controls and the other groups in the mitochondrial ($F(3,16)= 2.21$; $p > 0.12$) and cytosolic ($F(3,20)= 1.64$; $p > 0.21$) fractions, indicating that the inhibition caused by cystine was reversible, possibly occurring through oxidation of the thiol groups of the enzyme (Table 1).

Next, cystine at 0.2, 0.5, and 1.0 mM final concentrations was added to the incubation medium containing the cytosolic or the mitochondrial kidney fractions obtained from non-treated rats without preincubation, or preincubated for 30 and 60 min. The linear regression showed that cystine significantly inhibited CK activity in the cytosolic fraction in all assays in a concentration-dependent way: $F(1,26) = 36.84$; $\beta = -0.77$; $p < 0.0001$ (without preincubation); $F(1,26) = 52.52$; $\beta = -0.82$; $p < 0.0001$ (30 min of preincubation); $F(1,26) = 23.63$; $\beta = -0.69$; $p < 0.0001$ (60 min of preincubation) (Fig. 1A). The same pattern of inhibition was observed for CK activity in the mitochondrial fraction: $F(1,26) = 125.81$; $\beta = -0.91$; $p < 0.0001$ (without preincubation); $F(1,26) = 32.67$; $\beta = -0.75$; $p < 0.0001$ (30 min of preincubation); $F(1,26) = 16.46$; $\beta = -0.62$; $p < 0.001$ (60 min of preincubation) (Fig. 1B). The linear regression also showed that cystine inhibited CK activity at all tested concentrations in a time-dependent way in the cytosolic fraction ($F(1,19) = 26.68$; $\beta = -0.76$; $p < 0.001$ (control); $F(1,19) = 88.42$; $\beta = -0.91$; $p < 0.0001$ (0.2 mM cystine); $F(1,19) = 38.55$; $\beta = -0.82$; $p < 0.0001$ (0.5 mM cystine); $F(1,19) = 20.40$; $\beta = -0.72$; $p < 0.001$ (1 mM cystine). However, in the mitochondrial fraction, no time-dependent inhibition was observed.

Considering that CK is a thiol-enzyme and cystine is a disulfide, we investigated the *in vitro* effects of GSH on the CK inhibitory effects of cystine. We first evaluated whether the inhibition caused by 0.5 mM cystine on CK activity was preventable or reversible, by adding 1 mM GSH in the cytosolic and mitochondrial fractions, without preincubation or with preincubation of 30 or 60 min. Our results showed that cystine inhibited the cytosolic CK activity, whereas GSH fully prevented this inhibition without preincubation: ($F(3,20) = 11.21$; $p < 0.001$) or with 30 min of preincubation ($F(5,42) = 46.91$; $p < 0.001$). However, reversion and prevention induced by GSH were only partial when the preparations were preincubated for 60 min ($F(5,42) = 49.18$; $p < 0.001$). Cystine

also inhibited the mitochondrial CK activity and GSH prevented this effect without preincubation ($F(3,28) = 6.9$; $p < 0.01$), and by preincubating the mitochondrial fraction for 30 min ($F(5,42) = 33.11$; $p < 0.001$) or 60 min ($F(5,42) = 6.34$; $p < 0.001$), but did not reverse the effect caused by cystine when preincubated for 30 or 60 min (Table 2).

Considering that cysteamine (CSH) is a thiol-compound like GSH and has been used in the treatment of patients with cystinosis, we also investigated CSH effect on the inhibition of CK activity caused by cystine in the cytosolic and mitochondrial fractions, by adding 2.0 mM cysteamine without preincubation or after 30 or 60 min of preincubation with 0.5 mM cystine. Our results showed that 0.5 mM cystine inhibited the cytosolic CK activity, whereas CSH fully prevented the inhibition occurring without preincubation ($F(3,20) = 5.48$; $p < 0.01$), and partially prevented and reversed cystine-induced CK inhibition when preincubated for 30 min ($F(5,30) = 138.51$; $p < 0.001$) or for 60 min ($F(5,30) = 89.47$; $p < 0.001$). Cystine also inhibited the mitochondrial CK activity, whereas CSH fully prevented this inhibition in the absence of preincubation ($F(3,28) = 9.84$; $p < 0.001$) or when preincubated for 30 min ($F(5,42) = 28.3$; $p < 0.001$) or for 60 min ($F(5,42) = 9.55$; $p < 0.001$). CSH also fully reversed the CK inhibition caused by cystine when preincubated for 60 min and partially reversed this effect with 30 min of preincubation (Table 3).

In an attempt to better characterize the inhibition of CK activity caused by cystine, competition studies between cystine and the enzyme substrates ADP and phosphocreatine were performed in the absence of preincubation, according to the Lineweaver-Burk plot (not shown). The double-reciprocal plots showed that the inhibition caused by cystine on the cytosolic and mitochondrial CK activity was of the noncompetitive type for the two substrates, reinforcing the results obtained with GSH and cysteamine. The K_m values for the cytosolic CK calculated from the Lineweaver-Burk plot were 0.8 mM and 3.3 mM for

ADP and phosphocreatine, respectively; K_m values for the mitochondrial CK were 0.08 mM and 2.5 mM for ADP and phosphocreatine, respectively. Values of the inhibition constant (K_i) for cytosolic CK inhibition by cystine, calculated from the Dixon plot (not shown), were 0.5 mM and 0.2 mM for ADP and phosphocreatine, respectively; K_i values for the mitochondrial CK were 0.3 mM and 0.2 mM for ADP and phosphocreatine, respectively. Since K_i is the equilibrium constant for cystine binding and cystine concentration in kidney of patients with cystinosis is higher than 5 nmol/mg wet tissue (approximately 6 mM) (25), the CK isoforms would be strongly inhibited in case cystine is released from lysosomes.

Discussion

We first investigated the *in vivo* effects of cystine, cysteamine and cystine plus cysteamine on CK activity from kidney of young rats. The results showed that cystine administration reduced CK activity and co-administration of cysteamine prevented this inhibition. Furthermore, addition of GSH to the CK assay reversed the inhibition caused by cystine on CK activity, suggesting oxidation of critical thiol groups of the enzyme.

The *in vitro* experiments showed that cystine inhibited CK activity at different concentrations and times of preincubation. We then investigated the effects of GSH or CSH, on the inhibition caused by cystine in order to clarify the underlying mechanisms of this inhibition. We observed that the inhibitory effect of cystine on CK was both prevented and reversed by cysteamine, suggesting that this inhibition was probably mediated by modification of important sulfhydryl groups of the enzyme. Competition studies between cystine and ADP or phosphocreatine showed a noncompetitive pattern. The K_i values for cystine inhibition were at least 10-fold lower than cystine concentration found in the kidney of patients with cystinosis indicating that our results may be of pathophysiological significance (20).

Although tissue damage might depend on cystine accumulation, the mechanisms of cystine toxicity are still under investigation. Cystine is usually found inside the lysosomes. Mice lacking cystinosin accumulate cystine in the lysosomes but do not develop Fanconi syndrome (21), indicating that intralysosomal cystine accumulation per se may not cause tissue damage. Furthermore, histological studies in patients affected by cystinosis have shown a large accumulation of cystine in lysosomes of normally functioning cells, suggesting that cystine needs to be released from lysosomes to cause damage. There are several possibilities to explain how cystine could leave lysosomes and act into other cell compartments. It is possible that the small cystine crystals may partially disrupt the lysosomal membranes, since positive reactions for acid phosphatase, a lysosomal marker, was not always found in the periphery of the cystine crystals (22). Another possibility is the egress of cystine from lysosomes by secretion (23), followed by cystine transport back into the cytosol. In this context, it has been shown that cystine accumulates in the cytoplasm, nucleus and cytoplasmic inclusions of dark cells, as well as extracellularly in the liver and in the kidney of patients with cystinosis, and in biopsies of renal allografts from patients with cystinosis, indicating that cystine crystals may not be limited to lysosomes (24). Since the presence of dark cells is indicative of the early stages of autophagy (25), a form of cell death, it is conceivable that a great liberation of cystine into the cytosol caused by lysosomal membrane rupture or by cystine secretion and back transport could rapidly kill the cell. However, since cystine is nearly insoluble at pH ranging from 6 to 8, a rapid release of large amounts of cystine from its crystals killing cells is unlikely. Therefore, a slow dissolution of the cystine crystals may continuously liberate free cystine, leading to a sustained inhibition of thiol-containing enzymes and promoting cell death. On the other hand, it has been demonstrated a small and transient decrease of the glutathione pool in cystinotic cell lines during exponential growth phase (27), increasing four times the GSSG / GSH ratio (28). Considering that GSH slowly reacts

with cystine to generate cysteine (26), it is possible that the increased free cystine concentration may explain the low GSH levels found in these cells. Furthermore, it is known that GSH depletion induces the mitochondrial permeability transition (MPT) causing cell death by apoptosis (29). Lysosomes are involved in apoptosis (30), and recent experiments with fibroblasts from cystinotic patients have shown that these cells are more prone to apoptosis (31). These investigators suggested that cystine accumulated in lysosomes can be released during the early permeabilization phase causing apoptosis mediated by a caspase-dependent cell death. Similarly, apoptosis was also induced by cystine in cultured human retinal pigment epithelial cells (32). It is also possible that cystine released induces a necrotic-like cell death via a caspase-independent cell death (33). Moreover, it seems that the degree of ATP deprivation determines whether the cell death will occur by autophagy, apoptosis or necrosis (34). In this scenario, energy deficit was observed in renal tubule cells loaded with cystine dimethyl ester, corresponding to a model of cystinosis with Fanconi syndrome (35). Moreover, addition of creatine to the diet of mice fully suppress the apoptosis induced by TNF α (36), suggesting that apoptosis may be prevented by increasing energy metabolism.

Deficient activities of several thiol-containing enzymes, but not of non-thiol enzymes, was reported in *postmortem* liver and kidney tissues from patients with nephropathic cystinosis, but CK activity was not measured (20). It can not be discarded that these enzymes may have normal activities in the intact cells and be inhibited by cystine released from the lysosomes following cell lysis (37).

Mi-CK is part of a unique temporal and spatial energy buffer system in tissues with high energy requirements, being also important to inhibit the Ca⁺²-induced opening of the mitochondrial permeability transition pore which leads to apoptosis (38). It is well known that CK activity decreases after exposure to agents promoting generation of free radicals

probably by oxidation of the sulfhydryl residues of the enzyme (39). This may explain our results showing that GSH prevented the inhibitory effect of cystine on CK activity.

We have already demonstrated that cystine inhibits *in vitro* CK activity in rat brain (13). In the present study we demonstrate that cystine strongly inhibits *in vivo* and *in vitro* kidney CK activity and that cysteamine can prevent this inhibition. Considering that CK is a key enzyme for energy metabolism in renal cortex and outer medulla, in case cystine is released from lysosomes, these effects could also occur in the renal tubules of patients with cystinosis. Besides, other thiol-containing enzymes could be inhibited by a similar mechanism. In this case, it is possible to envisage that a diminution of these enzyme activities may potentially impair energy metabolism, contributing to the tissue damage through programmed cell death. This hypothesis is reinforced by other genetic (tyrosinemia, galactosemia, cytochrome C oxidase deficiency) and acquired (heavy metals, drugs, maleate) causes of Fanconi Syndrome, in which the accumulated toxic substances cause energy deficit (40). Considering that cysteamine is used to treat patients with cystinosis because it causes parenchymal organ cystine depletion (4), the present data provides another possible beneficial effect for the use of this drug since the protective effect of cysteamine could be important in preventing some metabolic consequences of cystine accumulation, such as inhibition of CK activity. Further studies are however necessary to evaluate the activity of CK in patients affected by cystinosis.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq-Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS, RS-Brazil) and Programa de Núcleos de Excelência-Financiadora de Estudos e Projetos (PRONEX II, FINEP-CNPq-Brazil).

References

- (1) Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA 2001 Cystinosis: a disorder of lysosomal membrane transport. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*. McGraw-Hill, New York, 8th ed., pp 5085-5108
- (2) Town M, Jean G, Cherqui S, Attard M, Forestier L, Whitmore SA, Callen DF, Gribouval O, Broyer M, Bates GP, van't Hoff W, Antignac C 1998 A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet* 18:319-324
- (3) Schneider JA, Clark KF, Greene AA, Reisch JS, Markello TC, Gahl WA, Thoene JG, Noonan PK, Berry KA 1995 Recent advances in the treatment of cystinosis. *J Inher Metab Dis* 18:387-397
- (4) Gahl WA, Charnas L, Markello TC, Bernardini I, Ishak KG, Dalakas MC 1992 Parenchymal organ cystine depletion with long-term cysteamine therapy. *Biochem Med Metab Biol* 48:275-285
- (5) Baum M 1998 The Fanconi syndrome of cystinosis: insights into the pathophysiology. *Pediatr Nephrol* 12: 492-497
- (6) Mahoney CP, Striker GE 2000 Early development of the renal lesions in infantile cystinosis. *Pediatr Nephrol* 15:50-56
- (7) Laube GF, Haq MR, van't Hoff WG 2005 Exfoliated human proximal tubular cells: a model of cystinosis and Fanconi syndrome. *Pediatr Nephrol* 20:136-140
- (8) Gilbert HF 1984 Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange. *Meth Enzymol* 107:330-351
- (9) Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM 1992 Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues

with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 281:21–40

- (10) Friedman DL, Perryman MB 1991 Compartmentation of multiple forms of creatine kinase in the distal nephron of the rat kidney. *J Biol Chem* 266:22404-22410
- (11) Çetinkaya I, Schlatter E, Hirsch JR, Herter P, Harms E, Kleta R 2002 Inhibition of Na⁺-dependent transporters in cystine-loaded human renal cells: electrophysiological studies on the Fanconi syndrome of cystinosis. *J Am Soc Nephrol* 13:2085-2093
- (12) Guimarães CA, Linden R 2004 Programmed cell death: apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem* 271:1638-1650
- (13) Fleck RM, Rodrigues Jr V, Giacomazzi J, Parissoto D, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM 2005 Cysteamine prevents and reverses the inhibition of creatine kinase activity caused by cystine in rat brain cortex. *Neurochem Int* 46:391-397
- (14) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- (15) Sullivan MX, Hess WC, Howard HW 1942 The quantitative estimation of both cystine and cystein in mixture. *J Biol Chem* 145:621-624
- (16) Hughes BP 1962 A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clin Chim Acta* 7:597–603
- (17) Lash LH 2005 Role of glutathione transport processes in kidney function. *Toxicol Appl Pharmacol* 204: 329-342
- (18) Lineweaver H, Burk D 1934 The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc* 56:658-666
- (19) Dixon M, Webb E C 1964 *Enzyme Kinetics*. 2nd Ed. Longman, London, UK.

- (20) Patrick AD 1965 Deficiencies of SH-dependent enzymes in cystinosis. *Clin Sci* 28:427-443
- (21) Cherqui S, Sevin C, Hamard G, Kalatzis V, Sich M, Pequignot MO, Gogat K, Abitbol M, Broyer M, Gubler MC, Antignac C 2002 Intralysosomal cystine accumulation in mice lacking cystinosin, the protein defective in cystinosis. *Mol Cell Biol* 22:7622-7632
- (22) Koizumi F, Koeda T, Wakaki K, Matumoto M, Kobashi K, Akao T, Fukase M 1985 Cystinosis with marked atrophy of the kidneys and thyroid. Histological and ultrastructural studies in an autopsy case. *Acta Pathol Jpn* 35:145-155
- (23) Andrews NW 2000 Regulated secretion of conventional lysosomes. *Trends Cell Biol* 10: 316-321
- (24) Spear GS, Gubler MC, Habib R, Broyer M 1989 Dark cells of cystinosis: occurrence in renal allografts. *Hum Pathol* 20:472-476
- (25) Clarke PG 1990 Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol* 181:195-213
- (26) Jones DP, Go YM, Anderson CL, Ziegler TR, Kinkade JM Jr, Kirilin WA 2004 Cysteine/cystine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologic redox signaling and control. *FASEB J* 18:1246-1248
- (27) Chol M, Nevo N, Cherqui S, Antignac C, Rustin P 2004 Glutathione precursors replenish decreased glutathione pool in cystinotic cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 324:231-235
- (28) Wilmer MJ, de Graaf-Hess A, Blom HJ, Dijkman HB, Monnens LA, van den Heuvel LP, Levtchenko EN. 2005 Elevated oxidized glutathione in cystinotic proximal tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 337:610-614.

- (29) Armstrong JS, Jones DP 2002 Glutathione depletion enforces the mitochondrial permeability transition and causes cell death in Bcl-2 overexpressing HL60 cells. FASEB J 16:1263-1265
- (30) Stoka V, Turk B, Schendel SL, Kim TH, Cirman T, Snipas SJ, Ellerby LM, Bredesen D, Freeze H, Abrahamson M, Bromme D, Krajewski S, Reed JC, Yin XM, Turk V, Salvesen GS 2001 Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. J Biol Chem 276:3149-3157
- (31) Park MA, Thoene JG 2005 Potential role of apoptosis in development of the cystinotic phenotype. Pediatr Nephrol 20:441-446
- (32) Jiang S, Moriarty-Craige SE, Orr M, Cai J, Sternberg P Jr, Jones DP 2005 Oxidant-induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells: dependence on extracellular redox state. Invest Ophthalmol Vis Sci 46:1054-1061
- (33) Kitanaka C, Kuchino Y 1999 Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. Cell Death Differ 6:508-515
- (34) Burlacu A, Jinga V, Gafencu AV, Simionescu M 2001 Severity of oxidative stress generates different mechanisms of endothelial cell death. Cell Tissue Res 306:409-416
- (35) Ben-Nun A, Bashan N, Potashnik R, Cohen-Luria R, Moran A 1993 Cystine loading induces Fanconi's syndrome in rats: *in vivo* and vesicle studies. Am J Physiol 265:839-844
- (36) Hatano E, Tanaka A, Kanazawa A, Tsuyuki S, Tsunekawa S, Iwata S, Takahashi R, Chance B, Yamaoka Y 2004 Inhibition of tumor necrosis factor-induced apoptosis in transgenic mouse liver expressing creatine kinase. Liver Int 24:384-393

- (37) Schneider JA, Schulman JD 1983 Cystinosis. In: Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JL, Brown MS (eds) *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, 5th ed., pp 1844-1866
- (38) O’Gorman E, Beutner G, Dolder M, Koretsky AP, Brdiczka D, Wallimann T 1997 The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* 414:253–257
- (39) Koufen P, Stark G 2000 Free radical induced inactivation of creatine kinase: sites of interaction, protection, and recovery. *Biochim Biophys Acta* 1501:44-50
- (40) Bergeron M, Gougoux A, Noël J, Parent L 2001 The renal Fanconi syndrome. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*. McGraw-Hill, New York, 8th ed., pp 5023-5038

Figure 1. *In vitro* effects of cystine (Cys) for 0 (without preincubation) 30 and 60 min of preincubation on creatine kinase activity in cytosolic (A) and mitochondrial (B) fractions in the kidney from young rats.

Creatine kinase activity is expressed as nmol creatine per minute per mg protein. Data are means \pm SD for n = 6-8 independent experiments performed in triplicate.

* p<0.01; ** p<0.001 compared to control (Tukey test).

□ None (Control); ■ Cys 0.2 mM; ▨ Cys 0.5 mM; ■ Cys 1 mM

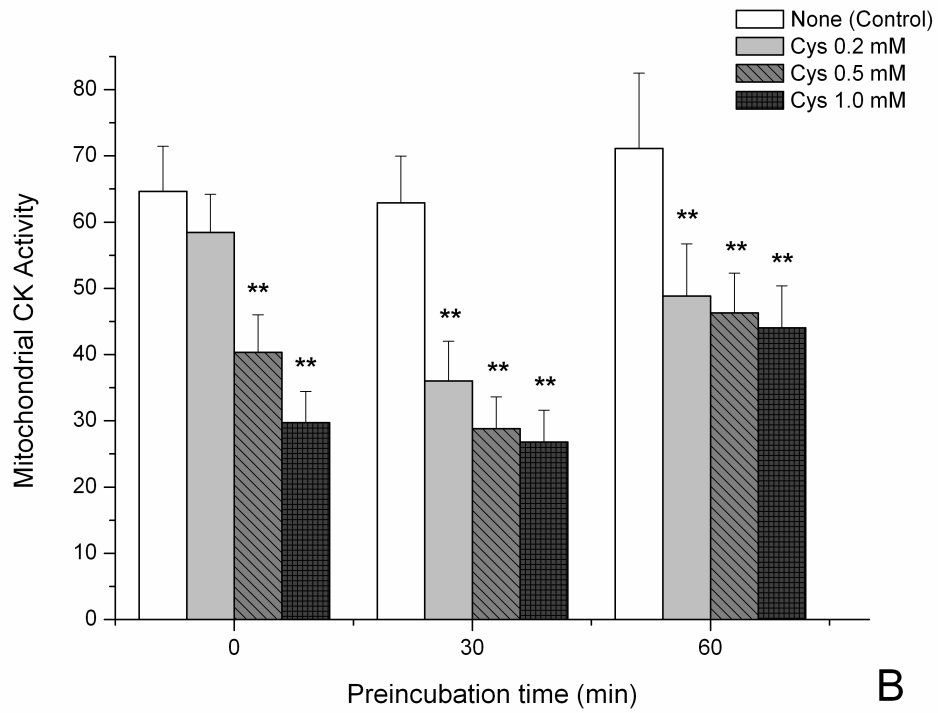
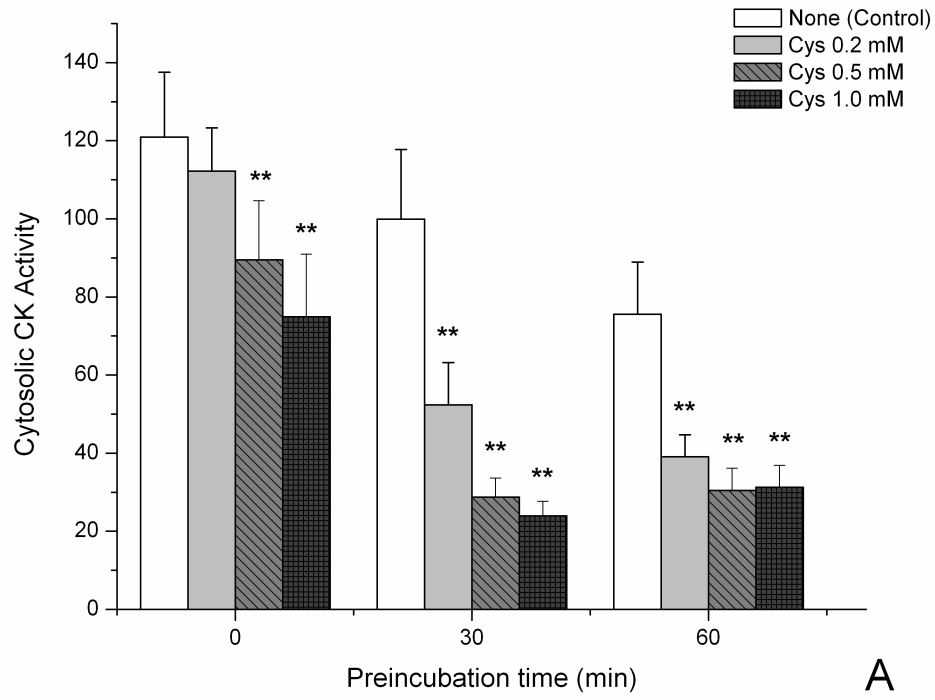


Table 1. *In vivo* effect of cystine (Cys), cysteamine (CSH), cystine plus cysteamine (Cys + CSH) on creatine kinase activity in cytosolic and mitochondrial fractions in the kidney from young rats.

| Cellular fraction | Group | | | |
|--------------------------|--------------|------------|------------|----------------------|
| | Control | Cystine | Cysteamine | Cystine + Cysteamine |
| Mitochondrial | 101 ± 7 | 84 ± 9 * | 90 ± 8 | 91 ± 10 |
| Mitochondrial + GSH | 110 ± 7 | 108 ± 11 | 102 ± 14 | 92 ± 9 |
| Cytosolic | 121 ± 7 | 105 ± 6 ** | 123 ± 5 | 118 ± 9 |
| Cytosolic + GSH | 116 ± 8 | 110 ± 6 | 123 ± 17 | 118 ± 10 |

Creatine kinase activity is expressed as nmol creatine per minute per mg protein. Data are means ± SD for n = 5-6 independent experiments performed in triplicate.

*p < 0.05; ** p < 0.01 compared to control (Tukey test).

Table 2. *In vitro* effect of reduced glutathione (GSH) added before (pre) or after (post) preincubation with cystine for different times on creatine kinase activity in the kidney from young rats in the presence or absence cystine (Cys).

| Cellular fraction | Mitochondrial | | | Cytosolic | | |
|--------------------------------------|---------------------------------|----------------|----------------|---------------------------------|---------------------|---------------------|
| Group | Preincubation time (min) | | | Preincubation time (min) | | |
| | 0 | 30 | 60 | 0 | 30 | 60 |
| Control (Cys 0 mM) | 74 ± 11 | 88 ± 11 | 107 ± 11 | 110 ± 5 | 100 ± 16 | 105 ± 14 |
| GSH 1 mM pre | 77 ± 13 | 101 ± 11 | 107 ± 11 | 114 ± 12 | 110 ± 10 | 115 ± 11 |
| GSH 1 mM post | - | 94 ± 15 | 100 ± 15 | - | 105 ± 18 | 111 ± 18 |
| Cys 0.5 mM | 55 ± 4 a** | 49 ± 8 a** | 84 ± 8 a** | 88 ± 7 a** | 33 ± 5 a** | 40 ± 6 a** |
| Cys 0.5 mM + GSH 1mM pre | 70 ± 13 | 89 ± 9 | 101 ± 9 | 112 ± 11 | 91 ± 10 | 85 ± 8 a*, b** |
| Cys 0.5 mM + GSH 1mM post | - | 53 ± 10 a** | 82 ± 10 a** | - | 60 ± 11 a**, b** | 66 ± 11 a**, b** |

Creatine kinase activity is expressed as nmol creatine per minute per mg protein.

Data are means ± SD for n = 6-8 independent experiments performed in triplicate.

*p < 0.05; **p < 0.01 for: a = different from the other groups; b = different from

Cys 0.5 mM (Tukey test).

Table 3. *In vitro* effect of cysteamine (CSH) added before (pre) or after (post) preincubation with cystine for different times on creatine kinase activity in the kidney from young rats in the presence or absence of 0.5 mM cystine (Cys).

| Cellular fraction | Mitochondrial | | | Cytosolic | | |
|---------------------------------------|--------------------------|---------------|---------------|--------------------------|---------------|---------------|
| Group | Preincubation time (min) | | | Preincubation time (min) | | |
| | 0 | 30 | 60 | 0 | 30 | 60 |
| Control (Cys 0 mM) | 66 ± 8 | 74 ± 8 | 98 ± 11 | 123 ± 9 | 105 ± 8 | 116 ± 8 |
| CSH 2 mM pre | 74 ± 14 | 84 ± 7 | 105 ± 8 | 117 ± 12 | 108 ± 5 | 110 ± 9 |
| CSH 2 mM post | - | 75 ± 13 | 100 ± 15 | - | 111 ± 7 | 109 ± 9 |
| Cys 0.5 mM | 51 ± 6 a* | 39 ± 5 a** | 70 ± 10 a* | 99 ± 10 b* | 33 ± 2 a** | 44 ± 4 a** |
| Cys 0.5 mM + CSH 2 mM pre | 80 ± 14 | 84 ± 10 | 104 ± 10 | 111 ± 13 b* | 90 ± 4 | 85 ± 4 b* |
| Cys 0.5 mM + CSH 2 mM post | - | 59 ± 9 a* | 100 ± 15 | - | 79 ± 8 b** | 73 ± 8 b** |

Creatine kinase activity is expressed as nmol creatine per minute per mg protein.

Data are means ± SD for n = 6-8 independent experiments performed in triplicate.

*p < 0.05; **p < 0.01 for: a = different from the other groups, b = different

from the control (Tukey test).

Objetivo 2 - Investigar o efeito da administração do dimetil cistina éster e/ou cisteamina sobre as atividades da piruvatoquinase em homogeneizado livre de mitocôndrias e da creatinaquinase nas frações mitocondrial e citosólica de rim e de cérebro de ratos Wistar jovens;

Artigo 2

Sobrecarga de dimetil cistina éster inibe enzimas tiólicas em córtex cerebral e rim de ratos

Virginia Cielo Rech, Luciane Rosa Feksa, Rochele Marisa Müller Fleck, Genaro Azambuja Athaydes, Paula Karina Barcelos Dornelles, Valnes Rodrigues-Junior, Clovis Milton Duval Wannmacher. Cystine dimethylester loading inhibits thiol-containing enzymes in brain cortex and kidneys of rats. Submetido à publicação na revista Archives of Medical Research

**Cystine dimethylester loading inhibits thiol-containing enzymes in brain cortex and
kidneys of rats**

Virginia Cielo Rech, Luciane Rosa Feksa, Rochele Marisa Müller Fleck,
Genaro Azambuja Athaydes, Paula Karina Barcelos Dornelles, Valnes Rodrigues-
Junior, Clovis Milton Duval Wannmacher

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos
2600, CEP 90.035-003, RS, Brazil

Corresponding author: Clovis M. D. Wannmacher

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600, CEP 90.035-003, Porto Alegre, RS,
Brazil

Fax 55 51 33165535, E-mail. clovisdw@ufrgs.br

Running title: Cystine dimethylester inhibits thiol enzymes

Abstract

Background: Cystinosis is a systemic genetic disease caused by a lysosomal transport deficiency accumulating cystine in the lysosomes of all tissues. Cystine accumulation induces decrease of intracellular ATP content with intact energy generating capacity of mitochondria. Although tissue damage might depend on cystine accumulation, the mechanisms of tissue damage are still obscures. Considering that thiol-containing enzymes are critical for several metabolic pathways, our main objective was to investigate the effects of cystine dimethylester load on the thiol-containing enzymes creatine kinase and pyruvate kinase, in the kidney and brain of young Wistar rats.

Methods: Wistar rats were injected twice a day with 1.6 $\mu\text{mol/g}$ body weight cystine dimethylester and/or 0.46 $\mu\text{mol/g}$ body weight cysteamine from the 16th to the 20th postpartum day and killed after 12 hours.

Results: Cystine dimethylester administration decreased thiol/disulfide ratio and inhibited the two enzyme activities. Co-administration of cysteamine, the drug used to treat cystinotic patients, normalized thiol/disulfide ratio and the two enzyme activities.

Conclusions: Cystine inhibits creatine kinase and pyruvate activities possibly by oxidation of the sulfhydryl groups of the enzymes. Considering that creatine kinase and pyruvate kinase, like other thiol-containing enzymes, are crucial for energy homeostasis and antioxidant defenses, the enzymes inhibition caused by cystine released from lysosomes could be a mechanism of tissue damage in patients with cystinosis.

Key words: creatine kinase; cysteamine; cystine dimethylester; cystinosis; pyruvate kinase.

Introduction

Nephropathic cystinosis is an autosomal recessive disease characterized by a defect in the transport of cystine out of lysosomes, with the consequent intralysosomal accumulation of cystine in most of body tissues [1]. Cystinosis is caused by deficient expression of the gene encoding cystinosin, the lysosomal membrane cystine exporter [2]. Cystine accumulation leads to renal failure and other systemic complications in non-treated cystinotic children [3]. The treatment with cysteamine (CSH) reduces intracellular accumulation of cystine, extending patients life [4]. Fanconi syndrome, the most prominent clinical aspect of the disease, is characterized by severe electrolyte disturbances, urinary loss of solutes and failure to thrive [5]. Histopathological studies in the kidneys of cystinotic children showed a temporal relationship between cystine accumulation in the proximal renal tubules and the development of the characteristic “swan neck” lesion of the Fanconi syndrome [6]. Surviving adult patients may present brain cortical atrophy with low cognitive performance, confusion, memory loss, and visual processing impairments [7,8]. Severe cerebral involvement with necrosis, spongy change, and vacuolization may produce profound neurological deficits [9].

It is well known that some thiol-containing enzymes may have their activities altered by thiol/disulfide exchange between the protein sulfhydryl groups and disulfides [10]. Pyruvate kinase (ATP:pyruvate 2-O-phosphotransferase, EC 2.7. 1. 40) and creatine kinase (EC 2.7.3.2) are two thiol-containing enzymes critical for energy metabolism in almost all mammalian tissues. Pyruvate kinase (PK) is a crucial enzyme of glucose metabolism, the main pathway that provides energy for brain and kidney function. There are at least four known isozymic forms of PK in vertebrates, designed as L (liver), M1 (brain, muscle), M2 (kidney) and R (erythrocyte). These isozymes differ in their chemical, physical, kinetic,

electrophoretic, and immunological properties, as well as their tissue distribution [11]. M1 and M2 isozymes are different products of the same gene and all studied PK isoforms present a tetrameric structure and thiol groups necessary for functioning. We have demonstrated that cystine inhibits the *in vitro* activity of PK from the brain cortex of young rats [12].

Creatine kinase (CK) is a thiol-containing enzyme that catalyses the reversible transfer of the phosphoryl group from phosphocreatine to ADP, regenerating ATP. This enzyme exerts a key role for cellular energy metabolism of tissues with high-energy requirements. There are distinct CK isoenzymes, which are compartmentalized specifically in the places where energy is liberated (mitochondria) or utilized (cytosol). The kidney and the brain contain BB-CK (cytosolic isoform) and ubiquitous Mi-CK (mitochondrial isoform). In the kidney, these enzymes are localized in cortex and outer medulla, possibly supplying energy necessary for sodium transport [13]. Reduced brain CK/creatine system has been found in patients with diseases affecting brain function [14]. We have reported that cystine inhibits the *in vitro* CK activity in the brain [15] and kidney [16] of young rats. Considering that cystine is a disulfide, it is possible that it may act on intracellular thiol-containing enzymes, like CK and PK, impairing energy homeostasis with consequent cell death [17].

Animal models of cystinosis have been developed by knock out [18] or by loading lysosomes with cystine dimethylester (CDME) [19-21]. Knock out mice lacking cystinosin accumulate cystine in lysosomes but do not develop Fanconi syndrome, suggesting that cystine accumulation per se may be not sufficient for tissue damage. Renal tubule cells of rats loaded with CDME developed Fanconi syndrome associated to a decrease in energy metabolism and inhibition of sodium-dependent transporters in human kidney epithelial cells, suggesting a deficit of

energy [21,22]. Recent investigations performed on cystinotic fibroblasts demonstrated altered status of glutathione [23] and decreased intracellular ATP content with intact mitochondrial energy generating capacity [24]. Therefore, the main objective of the present study was to investigate the *in vivo* effects of CDME administration on thiol/disulfide content and on CK and PK activities in the kidney and brain cortex of young Wistar rats. We also investigated the effects of the co-administration of CSH on the same enzyme activities. Lactate dehydrogenase (LDH:E.C. 1.1.1.27), a non thiol-containing enzyme, was also assayed.

Methods

Animals and reagents

Wistar rats bred in the Department of Biochemistry, UFRGS, were used in the experiments. The animals were kept with dams until they were sacrificed. The dams had free access to water and to a standard commercial chow (Supra, Porto Alegre, RS, Brazil) containing 20.5% protein (predominantly soybean supplemented with methionine), 54% carbohydrate, 4.5% fiber, 4% lipids, 7% ash and 10% moisture. Temperature was maintained at 24 ± 1 °C, with a 12-12 h light-dark cycle. The “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication 85-23, revised 1985) were followed in all the experiments, and the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Rio Grande do Sul approved the experimental protocol. All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

In vivo experiments

Thirty-two rats were randomly separated into four groups and were treated from the 16th to the 20th postpartum day. The animals were kept with dams while

receiving administration of 20 $\mu\text{L/g}$ body weight of one of the following buffered solutions (pH 7.4), twice a day at 12 hours interval: 0.85 g% saline (control group), 80 mM CDME (CDME group), 13 mM cysteamine (CSH group), or 80 mM CDME + 13 mM CSH (CDME + CSH group). CSH was administered subcutaneously and saline or CDME were administered intraperitoneally. CDME dose was equivalent to that used to load lysosomes in adult rats [19, 20]; cysteamine dose was equivalent to that used for the treatment of the patients [1]. Rats were killed in the 21st day, twelve hours after the last injection. At this age, Wistar rat development is equivalent to the development of a 6-years-old child.

Preparation of renal and brain tissues

Treated animals were killed by decapitation without anesthesia, the kidneys and the brains were rapidly removed. The kidney was decapsulated, the brain cortex was dissected, and the two tissues were homogenized with a Teflon-glass homogenizer in 5 volumes of ice-cold SET buffer (0.32 M sucrose, 1 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl), pH 7.4. The homogenate was centrifuged at 800 x g and the pellet was discarded. The supernatant was centrifuged at 10,000 x g for 10 min. The supernatant solution containing cytosol and other cellular components such as endoplasmic reticulum and lysosomes, was collected for determination of pyruvate kinase, cytosolic CK and LDH activities. The pellet, containing mitochondria, was washed twice with the same Tris-sucrose isotonic buffer, resuspended in 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 9 mM MgSO_4 for determination of mitochondrial CK activity. All steps were performed at 4 °C. The subcellular fractions were stored for no more than 1 week at -70 °C when the assay was not carried out immediately. The mitochondrial fraction was frozen and thawed three

times immediately before the assay, to break mitochondrial membranes, facilitating the interaction between CK and the substrates.

Creatine kinase activity assay

The reaction mixture contained the following final concentrations: 300 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 7 mM phosphocreatine, 9 mM MgSO₄, and approximately 1 µg protein in a final volume of 0.13 mL. After a preincubation by 5 min at 37 °C, the enzymatic reaction was started by the addition of 0.42 µmol ADP. The reaction was stopped after the incubation for 10 minutes by the addition of 1 µmol p-hydroxymercuribenzoic acid. The reagent concentrations and the incubation time were chosen to assure linearity of the enzymatic reaction. Appropriate controls were carried out to discount chemical hydrolysis of phosphocreatine and the amount of creatine already present in the enzymatic material. The creatine formed by the enzymatic action was estimated according to the colorimetric method of Hughes [25]. The color was developed by the addition of 0.1 mL 2 % α-naphtol and 0.1 mL 0.05 % diacetyl in a final volume of 1 mL and read after 20 minutes at 540 nm. CDME or CSH did not interfere with the color development or spectrophotometric readings. Results were expressed as nmol of creatine formed per min per mg protein.

Pyruvate kinase activity assay

Pyruvate kinase activity was assayed essentially as described by Leong et al [26]. The incubation medium consisted of 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 0.16 mM NADH, 75 mM KCl, 5.0 mM ADP, 7 units of L-lactate dehydrogenase, 0.1 % (v / v) Triton X-100, and 10 µL of the mitochondria-free supernatant in a final volume of 0.5 mL. The reaction was started after 30 min of pre-incubation at 37 °C by the addition of 1.0 mM phosphoenolpyruvate. NADH

oxidation was recorded spectrophotometrically during 2 min at 340 nm. All assays were performed in triplicate at 25 °C. Reagents concentration and assay time (2 min) were chosen to assure the linearity of the reaction. Results were expressed as μmol of pyruvate formed per min per mg of protein. CDME or CSH did not interfere with LDH activity or with spectrophotometric readings.

Lactate dehydrogenase assay

LDH activity was assayed essentially as described by Kaplan et al, [27]. The incubation medium consisted of 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.2, 0.3 mM NADH, 0.2 M sodium chloride, 30 mM sodium azide and 1 μL of the mitochondria-free supernatant in a final volume of 0.5 mL. The reaction was started after 5 min of pre-incubation at 37 °C by the addition of 2.0 mM sodium pyruvate. NADH oxidation was recorded spectrophotometrically during 2 min at 340 nm. All assays were performed in triplicate at 25 °C. Reagents concentration and assay time (2 min) were chosen to assure the linearity of the reaction. Results were expressed as μmol of pyruvate transformed per min per mg of protein. CDME or CSH did not interfere with spectrophotometric readings.

Determination of thiols and disulfides

Thiols and disulfides were determined essentially according to Zahler and Cleland [28]. The reaction medium consisted of 0.1 mL of 50 mM Tris buffer pH 9.0, 0.1 mL of 3 mM DTT (dithiothreitol), and 0.2 mL of cytosolic or mitochondrial fraction. After 20 min at room temperature, 0.2 mL of 1.0 M Tris buffer pH 8.1 and 1.5 mL of sodium arsenite were added. After 2 min, 0.1 mL of 3 mM DTNB (5,5'-dithiobis -2-nitrobenzoic acid) in 50 mM acetate buffer pH 5.0 were added and the absorbance at 412 nm was recorded for 3 min. For thiol determination, the same procedure was performed, omitting DTT and sodium arsenite. The disulfide content was calculated through the difference between the two determinations. A mixture of

cysteine and cystine was used as the standard. Results were expressed as mmol of cystine (disulfide) or mmol of cysteine (thiol) per mg of protein.

Protein determination

The protein content was determined by the method of Lowry et al. [29] using bovine serum albumin as the standard. CDME and CSH did not interfere in the reaction.

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Tukey test when the *F* value was significant. All data were analyzed by the Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS 12.0 for Windows) [30].

Results

The animals receiving CDME administration presented less weight gain along the treatment than controls and rats receiving CSH. Cysteamine administration together with CDME did not increase weight gain. However, kidney and brain cortex weight, as well as protein content of the two tissues did not differ between the groups, indicating that the biochemical differences between the groups can not be attributed to protein loss (Table 1).

The animals injected with CDME presented significantly decreased thiol/disulfide ratio in the mitochondrial and in the cytosolic fractions of brain cortex (Table 2) and kidney (Table 3). It can be seen that creatine kinase was also decreased in the two subcellular fractions, as well as pyruvate kinase activity in the cytosolic fraction. Co-administration of CSH prevented the decrease of thiol/disulfide ratio and the reduction of the enzyme activities. Lactate dehydrogenase activity was not affected by the treatments (Tables 2 and 3).

Discussion

In the present work we investigated the effects of the administration of CDME, CSH or CDME + CSH on CK, PK and LDH activities of the brain and kidney of young rats. We observed that CDME administration reduced the activities of the thiol-containing enzymes CK and PK in the two tissues and co-administration of CSH prevented the inhibition. On the other hand, LDH activity, a non thiol-containing enzyme, was not altered in the two tissues.

We also observed that CDME administration reduced thiol/disulfide ratio and that co-administration of CSH restored thiol/disulfide ratio to normal. These results suggest that lysosomes loading with CDME might inhibit the two enzymes out of lysosomes possibly through oxidation of their thiol groups.

Although tissue damage in cystinosis might depend on cystine accumulation, the mechanisms of cystine toxicity are still unclear. Mice lacking cystinosin accumulate cystine in lysosomes but do not develop Fanconi syndrome [18], suggesting that cystine must leave the lysosomes for tissue damage, in agreement with the observation that large lysosomal accumulation of cystine is found in apparently normal functioning cells. One possibility to explain how cystine could leave lysosomes and act into other cell compartments is the egress of cystine from lysosomes by secretion [31], followed by cystine transport back into the cytosol. In this context, ultrastructural observations in the liver and in the kidney of patients with cystinosis, showed cystine accumulation in the cytoplasm, nucleus and cytoplasmic inclusions of dark cells, and even extracellularly, indicating that cystine crystals may be not always limited to lysosomes [32]. The presence of dark cells is indicative of the early stages of autophagy [33], a form of cell death, suggesting that release of cystine from lysosomes may induce cell death. Considering that cystine is poorly soluble at pH ranging 6 to 8, dissolution of the cystine crystal liberated from

the lysosomes would liberate free cystine slowly, inhibiting thiol-containing enzymes and promoting cell death. Considering that GSH (reduced glutathione) reacts with cystine to generate cysteine [34], the increase in free soluble cystine could explain the decrease of the glutathione pool [35], and the four times decrease of the GSH / GSSG (thiol / disulfide) ratio in cystinotic cells [36]. On the other hand, it is known that GSH depletion induces cell death by apoptosis [37]. Recent experiments with fibroblasts from cystinotic patients suggest that lysosomal cystine accumulated can be released during the early permeabilization phase of lysosomes in apoptosis [38]. Apoptosis was also induced in cultured human retinal pigment epithelial cells by incubating with cystine [39]. In addition, it seems that the intensity of mitochondrial permeabilization with consequent reduction of ATP determines whether the cell death occurs by autophagy, apoptosis or necrosis [40]. This is reinforced by the observation that addition of creatine to the diet of mice increases mitochondrial activity and fully prevents the apoptosis induced by TNF α [41], suggesting that apoptosis may be prevented by increasing energy metabolism. The decrease of PK activity observed in the present work could reduce pyruvate levels inside the cells. Pyruvate, an intermediate metabolite of glucose metabolism, is an effective scavenger of reactive oxygen species [42]. Besides, pyruvate prevents neuronal death promoted by glycolytic inhibition by Zn²⁺, suggesting that pyruvate reduction may induce cell death [43]. Therefore, simultaneous diminution of PK and CK activities could strongly reduce energy metabolism and antioxidant defenses (pyruvate and GSH) with severe consequences for cell function and survival. The diminished activity of PK, CK, and possibly of other thiol-containing enzymes, might at least partially explain the decreased ATP content with normal energy generating capacity of mitochondria found in human cystinotic fibroblasts [24].

Deficient activities of several thiol-containing enzymes, but not of non-thiol enzymes, in postmortem liver and kidney tissues from patients with nephropathic cystinosis was reported, but PK and CK activities were not measured [44]. However, it cannot be excluded that these enzymes could have normal activities in the intact cells and be inhibited by cystine released from the lysosomes during the enzymes assay [45].

We have already demonstrated that cystine inhibits the *in vitro* PK and CK activities in rat brain and in kidney and that CSH prevents and reverses these inhibitions [12,15,16]. Now, we are demonstrating that CDME loading inhibits CK and PK activities in the brain and kidney of young rats and cysteamine prevents this inhibition. In case cystine is released from lysosomes, these effects could also occur in the tissues of patients with cystinosis. Besides, other thiol-containing enzymes could be inhibited by a similar mechanism. In this case, it is possible to envisage that a diminution of these enzyme activities might potentially impair energy metabolism, contributing to the tissue damage through programmed cell death. This hypothesis is reinforced by other genetic (tyrosinemia, galactosemia, cytochrome C oxidase deficiency) and acquired (heavy metals, drugs, maleate) causes of Fanconi Syndrome, in which accumulated toxic substances cause energy deficit and oxidative stress [46]. If inhibition of thiol-containing enzymes occurs in patients with cystinosis, the increase of thiol / disulfide ratio promoted by CSH administration could be important in preventing some metabolic consequences of cystine accumulation. However, further studies are necessary to evaluate the activity of thiol-containing enzymes like PK and CK in patients affected by cystinosis before and after CSH treatment.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq-Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS, RS-Brazil) and Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX-CNPq /FAPERGS -Brazil).

References

[1] Gahl WA., Thoene JG, Schneider JA Cystinosis: a disorder of lysosomal membrane transport. In: *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases* eds. Scriver C.R., Beaudet A.L. Sly W.S. & Valle D. McGraw-Hill, New York, 8th ed; 2001 pp 5085-5108

[2] Town M, Jean G, Cherqui S, Attard M, Forestier L, Whitmore SA, Callen DF, Gribouval O, Broyer M, Bates GP, van't Hoff W, Antignac C A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis, *Nat Genet* 1998;18: 319-324.

[3] Schneider JA, Clark KF, Greene AA, Reisch JS, Markello TC, Gahl WA, Thoene JG, Noonan PK, Berry KA Recent advances in the treatment of cystinosis, *J Inher Metab Dis* 1983; 18: 387-397.

[4] Gahl WA, Charnas L, Markello TC, Bernardini I, Ishak KG, Dalakas MC Parenchymal organ cystine depletion with long-term cysteamine therapy. *Biochem Med Metab Biol* 1992; 48: 275-285.

[5] Baum M The Fanconi syndrome of cystinosis: insights into the pathophysiology. *Pediatr Nephrol* 1998;12;:492-497.

[6] Mahoney CP, Striker GE Early development of the renal lesions in infantile cystinosis. *Pediatr Nephrol* 2000;15: 50-56.

[7] Jonas AJ, Conley SB, Marshall R, Johnson RA, Marks M, Rosenberg H Nephropathic cystinosis with central nervous system involvement. *Am J Med* 1987; 83: 966-970.

[8] Nichols SL, Press GL, Schneider JA, Trauner DA Cortical atrophy and cognitive performance in infantile nephropathic cystinosis. *Pediatr Neurol* 1990; 6: 379-381

[9] Vogel DG, Malekzadeh MH, Cornford ME, Schneider JA, Shields WD, Vinters HV Central nervous system involvement in nephropathic cystinosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1990; 49: 591-599.

[10] Gilbert HF Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange. *Meth Enzymol* 1984; 107: 330–351.

[11] Hall ER, Cottam GL Isoenzymes of pyruvate kinase in vertebrates: their physical, chemical, kinetic and immunological properties. *Int J Biochem* 1978; 9: 785 – 793.

[12] Feksa LR, Cornelio AR, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CMD Inhibition of pyruvate kinase activity by cystine in brain cortex of rats. *Brain Res* 2004; 1012: 93-100.

[13] Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the ‘phosphocreatine circuit’ for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 1992; 281: 21– 40.

[14] Schulze A Creatine deficiency syndromes. *Mol Cell Biochem* 2003; 244: 143-150.

[15] Fleck RM, Rodrigues Jr V, Giacomazzi J, Parissoto D, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CMD Cysteamine prevents and reverses the inhibition of creatine kinase activity caused by cystine in rat brain cortex. *Neurochem Int* 2005; 46: 391-397.

[16] Rech VC, Athaydes GA, Feksa LR, Dornelles PKB, Rodrigues-Junior V, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CMD Inhibition of creatine kinase activity by cystine in the kidney of young rats. *Pediatr Res* 2006; 60:190-195.

[17] Guimarães CA, Linden R Programmed cell death: apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem* 2004; 271: 1638-1650.

[18] Cherqui S, Sevin C, Hamard G, Kalatzis V, Sich M, Pequignot MO, Gogat K, Abitbol M, Broyer M, Gubler MC, Antignac C Intralysosomal cystine accumulation in mice lacking cystinosin, the protein defective in cystinosis. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 7622-7632.

[19] Foreman JW, Bowring MA, Lee J, States B, Segal S Effect of cystine dimethylester on renal solute handling and isolated renal tubule transport in the rat: a new model of the Fanconi syndrome. *Metabolism* 1987; 36: 1185-1191.

[20] Ben-Nun A, Bashan N, Potashnik R, Cohen-Luria R, Moran A Cystine loading induces Fanconi's syndrome in rats: in vivo and vesicle studies. *Am J Physiol* 1993; 265: 839-844.

[21] Çcetinkaya I, Schlatter E, Hirsch JR, Herter P, Harms E, Kleta R Inhibition of Na⁺-dependent transporters in cystine-loaded human renal cells: electrophysiological studies on the Fanconi syndrome of cystinosis. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2085-2093.

[22] Foreman JW, Benson LL, Wellons M, Avner ED, Sweeney W, Nissim I, Nissim I Metabolic studies of rat renal tubule cells loaded with cystine: the cystine dimethylester model of cystinosis, *J Am Soc Nephrol* 1995; 6: 269-272.

[23] Levtchenko E, Graaf-Hess A, Wilmer M, van der Heuvel L, Monnens L Blom H Altered status of glutathione and its metabolites in cystinotic cells. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 1828-1832.

[24] Levtchenko EN, Wilmer MJG, Janssen AJM, Koenderink JB, Visch AJ Willems PH, Graaf-Hess A, Blom HJ, van den Heuvel LP, Monnens LA Decreased ATP content and intact mitochondrial energy generating capacity in human cystinotic fibroblasts. *Pediatr Res* 2006; 59: 287-292.

- [25] Hughes BP A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clin Chim Acta* 1962; 7: 597–603.
- [26] Leong SF, Lai JC, Lim L, Clark JB Energy-metabolising enzymes in brain regions of adult and aging rats, *J Neurochem* 1981; 37: 1548 – 1556.
- [27] Kaplan A, Szabo LL, Opheim KE *Clinical Chemistry: Interpretation and techniques*. Lea and Febiger, Philadelphia, 1988 pp.186-189
- [28] Zahler WL, Cleland WW A specific and sensitive assay for disulfides. *J Biol Chem* 1968; 243: 716-719.
- [29] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265–275.
- [30] Leech NL, Barrett, KC, Morgan, GA. *SPSS for intermediate statistics. Use and interpretation*. Lawrence Erlbaum Associates, Publishers. London, 2nd Ed, 2005, pp 46-62
- [31] Andrews NW Regulated secretion of conventional lysosomes. *Trends Cell Biol* 2000; 10: 316-321.
- [32] Spear GS, Gubler MC, Habib R, Broyer M Dark cells of cystinosis: occurrence in renal allografts. *Hum Pathol* 1989; 20: 472-476.
- [33] Clarke PG Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol* 1990; 181:195-213.
- [34] Jones DP, Go YM, Anderson CL, Ziegler TR, Kinkade JM, Kirilin WA Cysteine/cystine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologic redox signaling and control. *FASEB J* 2004; 18: 1246-1248.
- [35] Chol M, Nevo N, Cherqui S, Antignac C, Rustin P Glutathione precursors replenish decreased glutathione pool in cystinotic cell lines. *Biochem Biophys Res Comm* 2004; 324: 231-235.

[36] Wilmer MJ, de Graaf-Hess A, Blom HJ, Dijkman HB, Monnens LA, van den Heuvel LP, Levtchenko EN Elevated oxidized glutathione in cystinotic proximal tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337: 610-614.

[37] Armstrong JS, Jones DP Glutathione depletion enforces the mitochondrial permeability transition and causes cell death in Bcl-2 overexpressing HL60 cells. *FASEB J* 2002; 16: 1263-1265.

[38] Park MA, Thoene JG Potential role of apoptosis in development of the cystinotic phenotype. *Pediatr Nephrol* 2005; 20: 441-446.

[39] Jiang S, Moriarty-Craige SE, Orr M, Cai J, Sternberg P, Jones DP Oxidant-induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells: dependence on extracellular redox state. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:1054-1061.

[40] Burlacu A, Jinga V, Gafencu AV, Simionescu M Severity of oxidative stress generates different mechanisms of endothelial cell death. *Cell Tissue Res* 2001; 306: 409-416.

[41] Hatano E, Tanaka A, Kanazawa A, Tsuyuki S, Tsunekawa S, Iwata S, Ellerby LM, Bredesen D, Freeze H, Abrahamson M, Bromme D, Krajewski S, Reed JC, Yin XM, Turk V Inhibition of tumor necrosis factor-induced apoptosis in transgenic mouse liver expressing creatine kinase. *Liver Int* 2004; 24: 384-393.

[42] Das UN Pyruvate is an endogenous anti-inflammatory and anti-oxidant molecule, *Med Sci Monit* 2006; 12: RA79-84

[43] Berry EV, Toms NJ Pyruvate and oxaloacetate limit zinc-induced oxidative HT-22 neuronal cell injury. *Neurotoxicology* (in press).

[44] Patrick AD Deficiencies of SH-dependent enzymes in cystinosis. *Clin Sci* 1965; 28: 427-443.

[45] Schneider JA, Schulman JD Cystinosis, In: The Metabolic Basis of Inherited Disease. eds Stanbury, Wyngaarden JB, Fredrickson DS Goldstein JL, Brown MS McGraw-Hill, New York, 5th ed; 1983 pp1844-1866.

[46] Bergeron M, Gougoux A, Noël J, Parent L The renal Fanconi syndrome. In: The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases. eds. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. McGraw-Hill, New York, 8th ed; 2001 pp 5023-5038.

Table 1. Effect of cystine dimethylester (CDME) and cysteamine (CSH) administration on body, kidney and brain cortex weight, and protein content of kidney and brain cortex of young rats.

| | Group | | | | ANOVA |
|---|-----------|------------|------------|------------|-------------------------|
| | Control | CDME | CSH | CDME + CSH | |
| Body weight gain along treatment (g) | 14 ± 2.7 | 9.8 ± 0.9* | 13.1 ± 3.7 | 8.8 ± 2.2* | F(3,26) = 4.91; P< 0.01 |
| Kidney | | | | | |
| Weight (mg) | 482 ± 134 | 446 ± 68 | 472 ± 133 | 454 ± 72 | F(3,26) = 0.39; P> 0.75 |
| Protein content (mg/g wet weight) | 81 ± 12 | 80 ± 4 | 82 ± 5 | 85 ± 7 | F(3,26) = 0.71; P> 0.55 |
| Brain cortex | | | | | |
| Weight (mg) | 730 ± 62 | 718 ± 42 | 718 ± 29 | 693 ± 31 | F(3,26) = 0.93; P> 0.43 |
| Protein content (mg/g wet weight) | 49 ± 3 | 51 ± 2 | 50 ± 3 | 49 ± 4 | F(3,26) = 0.94; P> 0.43 |

Data are means ± SD for 7-8 independent experiments performed in triplicate

*P <0.05 compared to control and CDME + CSH groups (Tukey test)

Table 2. Effect of cystine dimethylester (CDME) and cysteamine (CSH) administration on thiol and disulfide content and on creatine kinase, pyruvate kinase and lactate dehydrogenase activities in the brain cortex of young rats.

| Cellular fraction | Group | | | | ANOVA |
|---------------------------------|--------------|----------------|------------------|------------------|--------------------------|
| | Control | CDME | CSH | CDME + CSH | |
| Mitochondrial fraction | | | | | |
| Thiol content | 2.61 ± 0.15 | 1.63 ± 0.41*** | ± 2.44 ± 0.23 | ± 2.32 ± 0.21 | F(3,26) = 17.6; P< 0.001 |
| Disulfide content | 0.84 ± 0.16 | 0.62 ± 0.08*** | ± 0.51 ± 0.08*** | ± 0.71 ± 0.08 | F(3,26) = 12.7; P<0.001 |
| Thiol/disulfide ratio | 3.09 ± 0.42 | 2.58 ± 0.23*** | ± 4.71 ± 0.41*** | ± 3.24 ± 0.43 | F(3,26) = 8.7; P<0.001 |
| Creatine kinase activity | 0.71 ± 0.07 | 0.39 ± 0.09*** | ± 0.64 ± 0.07 | ± 0.67 ± 0.06 | F(3,26) = 27.8; P< 0.001 |
| Cytosolic fraction | | | | | |
| Thiol content | 0.84 ± 0.09 | 1.29 ± 0.18*** | ± 0.85 ± 0.06 | ± 1.31 ± 0.18*** | F(3,26) = 51.4; P< 0.001 |
| Disulfide content | 0.08 ± 0.03 | 0.17 ± 0.02*** | ± 0.09 ± 0.02 | ± 0.14 ± 0.02*** | F(3,26) = 15.8; P< 0.001 |
| Thiol/disulfide ratio | 10.51 ± 1.92 | 7.58 ± 1.14*** | ± 9.44 ± 0.97 | ± 9.35 ± 0.99 | F(3,26) = 6.9; P<0.001 |
| Creatine kinase activity | 0.98 ± 0.12 | 0.79 ± 0.11** | ± 0.95 ± 0.06 | ± 0.97 ± 0.03 | F(3,26) = 7.1; P< 0.001 |
| Pyruvate kinase activity | 1.91 ± 0.09 | 1.62 ± 0.17** | ± 1.83 ± 0.14 | ± 1.81 ± 0.11 | F(3,26) = 5.23; P< 0.01 |
| LDH activity | 15.45 ± 1.08 | 14.63 ± 0.81 | ± 14.37 ± 2.25 | ± 14.67 ± 0.88 | F(3,26) = 0.84; P> 0.48 |

Data are means ± SD for 7-8 independent experiments performed in triplicate

Thiol content is expressed as mmol cysteine per mg protein; disulfide content is expressed as mmol cystine per mg protein; creatine kinase activity is expressed as μmol creatine per minute per mg protein; pyruvate kinase activity is expressed as μmol pyruvate per min per mg protein; lactate dehydrogenase activity (LDH) is expressed as μmol pyruvate per min per mg protein.

P <0.01; *p < 0.001 compared to the other groups (Tukey test).

Table 3. Effect of cystine dimethylester (CDME) and cysteamine (CSH) administration on thiol and disulfide content and on creatine kinase, pyruvate kinase and lactate dehydrogenase activities in the kidney of young rats.

| Cellular fraction | Group | | | | ANOVA |
|---------------------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|--------------------------|
| | Control | CDME | CSH | CDME + CSH | |
| Mitochondrial fraction | | | | | |
| Thiol content | 0.79 ± 0.04 | 0.67 ± 0.09*** | 0.78 ± 0.06 | 0.75 ± 0.12 | F(3,26) = 4.1; P< 0.01 |
| Disulfide content | 0.29 ± 0.07 | 0.26 ± 0.04 | 0.25 ± 0.04 | 0.27 ± 0.06 | F(3,26) = 1.2; P> 0.31 |
| Thiol/disulfide ratio | 2.72 ± 0.24 | 2.57 ± 0.33** | 3.12 ± 0.35** | 2.77 ± 0.25 | F(3,26) = 3.8; P< 0.01 |
| Creatine kinase activity | 62.4 ± 3.4 | 55.2 ± 2.8** | 63.3 ± 3.3 | 60.5 ± 3.7 | F(3,26) = 7.1; P< 0.001 |
| Cytosolic fraction | | | | | |
| Thiol content | 0.23 ± 0.02** | 0.31 ± 0.04 | 0.34 ± 0.03 | 0.33 ± 0.02 | F(3,26) = 14.1; P< 0.001 |
| Disulfide content | 0.16 ± 0.01 | 0.26 ± 0.03*** | 0.16 ± 0.01 | 0.22 ± 0.01*** | F(3,26) = 12.9; P< 0.001 |
| Thiol/disulfide ratio | 1.44 ± 0.18 | 1.19 ± 0.21*** | 2.12 ± 0.22*** | 1.51 ± 0.17 | F(3,26) = 10.3; P< 0.001 |
| Creatine kinase activity | 88.5 ± 5.9 | 78.6 ± 6.9** | 86.2 ± 3.9 | 88.9 ± 7.6 | F(3,26) = 4.2; P< 0.01 |
| Pyruvate kinase activity | 30.65 ± 6.32 | 19.57 ± 3.01** | 27.34 ± 2.81 | 27.74 ± 6.05 | F(3,26) = 4.3; P< 0.01 |
| LDH activity | 16.57 ± 0.81 | 16.89 ± 0.96 | 16.41 ± 1.01 | 15.68 ± 1.13 | F(3,26) = 1.61; P> 0.21 |

Data are means ± SD for 7-8 independent experiments performed in triplicate

Thiol content is expressed as mmol cysteine per mg protein; disulfide content is expressed as mmol cystine per mg protein; creatine kinase activity is expressed as nmol creatine per minute per mg protein; pyruvate kinase activity is expressed as nmol pyruvate per min per mg protein; lactate dehydrogenase activity (LDH) is expressed as μmol pyruvate per min per mg protein.

P <0.01; *p < 0.001 compared to the other groups (Tukey test)

Objetivo 3 - Determinar o efeito da administração do dimetil cistina éster e/ou cisteamina sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em rim de ratos Wistar jovens.

Artigo 3

Promoção de estresse oxidativo em rim de ratos submetidos à sobrecarga de dimetil cistina éster

Virgínia Cielo Rech, Luciane Rosa Feksa, Maria Fernanda Arevalo do Amaral, Gustavo Waltereith Koch, Moacir Wajner, Carlos Severo Dutra-Filho, Angela Terezinha de Souza Wyse, Clovis Milton Duval Wannmacher. Promotion of oxidative stress in kidney of rats loaded with cystine dimethyl ester. Aceito para publicação na revista Pediatric Nephrology.

Promotion of oxidative stress in kidney of rats loaded with cystine dimethyl ester

Virgínia Cielo Rech, Luciane Rosa Feksa, Maria Fernanda Arevalo do Amaral, Gustavo Waltereith Koch, Moacir Wajner, Carlos Severo Dutra-Filho , Angela Terezinha de Souza Wyse, Clovis Milton Duval Wannmacher.

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author: Clovis M. D. Wannmacher

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600, CEP 90.035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55 51 3308 5575

Fax: + 55 51 3308 5535

E-mail: clovisdw@ufrgs.br

Running title: CDME induces oxidative stress

Abstract

Cystinosis is a systemic genetic disease caused by a lysosomal transport deficiency accumulating cystine in most tissues. Although tissue damage might depend on cystine accumulation, the mechanisms of tissue damage are not fully understood. Studies performed in fibroblasts of cystinotic patients and in kidney cells loaded with cystine dimethyl ester suggest that apoptosis is enhanced in this disease. Considering that oxidative stress is a known apoptosis inducer, our main objective was to investigate the effects of cystine dimethyl ester loading on several parameters of oxidative stress in the kidney of young rats. Animals were injected twice a day with 1.6 $\mu\text{mol/g}$ body weight cystine dimethyl ester and/or 0.26 $\mu\text{mol/g}$ body weight cysteamine from the 16th to the 20th postpartum day and killed after 1 or 12 hours. Cystine dimethyl ester induced lipoperoxidation, protein carbonylation, and stimulated superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities, probably through the formation of superoxide anions, hydrogen peroxide, and hydroxyl free radicals. Co-administration of cysteamine, the drug used to treat cystinotic patients, prevented, at least in part, those effects, possibly acting as a scavenger of free radicals. These results suggest that the induction of oxidative stress might be one of the mechanisms leading to tissue damage in cystinotic patients.

Keywords: cystinosis; cystine dimethyl ester; cystine, oxidative stress; kidney.

Introduction

Lysosomal cystine accumulation is the hallmark of cystinosis, a rare inherited disorder caused by a defect in the lysosomal cystine carrier cystinosin encoded by the *CTNS* gene, responsible for cystine exodus from lysosomes [1]. Accumulation of cystine results in multiple organ damage with renal lesion being the most pronounced in the first decade of life. Individuals with cystinosis experience both tubular dysfunction (renal Fanconi syndrome) and glomerular deterioration. The renal Fanconi syndrome usually occurs within the first year of life. Glomerular deterioration progresses throughout the first decade of life resulting in end-stage renal failure, unless patients are treated with cysteamine (CSH), a cystine-depleting drug [2].

Lysosomal loading with cystine dimethyl ester (CDME) has been used in the last decades for studying the pathogenesis of cystinosis. Isolated proximal tubule from rats and rabbits loaded with CDME developed defective proximal tubular reabsorption, similar to that of Fanconi syndrome in cystinosis [3-7]. The results obtained with CDME loading suggested that the Fanconi syndrome was caused by reduced mitochondrial ATP generation, leading to decreased activity of proximal tubular Na^+ , K^+ -ATPase and consequent diminution of Na^+ -coupled proximal transport of glucose, amino acids, ions and water [5, 7, 8]. However, recent studies showed that mitochondrial energy generation capacity in cystinotic fibroblasts and in human immortalized proximal tubular epithelial cells appears to be normal, and the observed mild decrease of intracellular ATP content seems insufficient to cause alterations of Na^+ , K^+ -ATPase activity [9, 10], suggesting that other mechanisms might account for the reduced enzyme activity. On the other hand, cystinotic cells, as well as normal cells loaded with CDME, are more susceptible to undergo apoptosis, even with normal energy mitochondria generating capacity [11].

Oxidative stress, often defined as an imbalance of pro-oxidants and antioxidants, has been associated with apoptosis [12]. Cystine markedly increases the cytotoxic response

of bacteria to hydrogen peroxide, suggesting that the amino acid might impair the cellular defense machinery against hydrogen peroxide. This effect may involve a thiol-disulfide exchange reaction at the cell membrane level [13]. An elevated GSSG/total GSH (%) ratio was observed in cystinotic cells, suggesting that increased oxidative stress might be present in cystinotic cells [14]. Inverse correlation between cystine accumulation and intracellular GSH content indicates that under stress conditions such as intensive energy demand or increased oxidative insult, cystinotic cells may be more prone to GSH depletion [9, 14, 15]. GSH depletion in cystinotic proximal tubule cells may be related to enhanced apoptosis [10].

Considering that apoptosis has been suggested as a possible mechanism of cell death in cystinosis, oxidative stress may induce apoptosis, and cystine is a potential pro-oxidant, our main objective was to investigate the effects of CDME loading on some parameters of oxidative stress in the kidney of young rats. We also examined the effect of cysteamine, a potential antioxidant, on the same enzymes activities.

Methods

Animals and reagents

Wistar rats bred in the Department of Biochemistry, UFRGS, were used in the experiments. The animals were kept with dams until they were sacrificed. The dams had free access to water and to a standard commercial chow (Supra, Porto Alegre, RS, Brazil) containing 20.5% protein (predominantly soybean supplemented with methionine), 54% carbohydrate, 4.5% fiber, 4% lipids, 7% ash and 10% moisture. The animals were maintained on a 12:12 h light / dark cycle (lights on 07.00 - 19.00 h) in conditioned constant temperature ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) colony room. The "Principles of laboratory animal care" (NIH publication no 80-23, revised 1996) were followed in all experiments and our research protocol was approved by the Ethical Committee for animal experimentation of

the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. All efforts were made to minimize animal suffering and to use only the number of animals necessary to produce reliable scientific data. All chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), except thiobarbituric acid, which was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and superoxide dismutase kit, which was obtained from RANDOX (Antrim, United Kingdom). CDME and CSH solutions were buffered to pH 7.4 with NaOH immediately before the administration to the animals. Thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), catalase activity (CAT), superoxide dismutase activity (SOD), glutathione peroxidase activity (GPx) and carbonyls content were measured with a spectrophotometer with temperature control (Hitachi U-2001). Oxidation of 2',7'-dihydrodichlorofluorescein (DCFH) was measured with a fluorescence spectrophotometer (Hitachi F 2000).

Cystine dimethyl ester (CDME) loading

Sixty-four rats were randomly separated into four groups and were treated from the 16th to the 20th postpartum day. The animals received administration of 20 μ L/g body weight of one of the following buffered solutions (pH 7.4), twice a day at 12 hours interval: 0.85 g% saline (control group), 80 mM CDME (CDME group), 13 mM cysteamine (CSH group), or 80 mM CDME + 13 mM CSH (CDME + CSH group). CSH was administered subcutaneously and CDME was administered intraperitoneally. CDME dose was equivalent to that used to load lysosomes in adult rats [3, 7] and cysteamine dose was equivalent to that used for the treatment of the patients [16]. Rats were sacrificed in the 21st day, half one hour after the last injections, and the others twelve hours after the last injection. At this age, Wistar rat development is equivalent to the development of a 6-years-old child. Treated animals were sacrificed by decapitation without anesthesia, and the kidneys were rapidly removed. The kidneys were decapsulated and homogenized with a Teflon-glass homogenizer in 5 volumes of ice-cold SET buffer (0.32 M sucrose, 1 mM

EGTA, 10 mM Tris-HCl), pH 7.4. The homogenate was centrifuged at 800 x g and the pellet was discarded. The supernatant solution containing mitochondria, cytosol and other cellular components such as endoplasmic reticulum and lysosomes, was collected for determination of the parameters of oxidative stress. The supernatants were stored for no more than 1 week at -70 °C when the assay was not carried out immediately.

Thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS)

TBA-RS was determined according to the method described by Esterbauer and Cheeseman [17]. TBA-RS measures malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation caused mainly by hydroxyls free radicals. Hydroxyl free radicals are mainly formed from H₂O₂ by the iron-catalyzed Fenton reaction or by the Haber-Weiss reaction [18]. Briefly, 500 µL of cold 10% trichloroacetic acid were added to 250 µL of the supernatants and centrifuged at 800 x g for 10 min. The reaction mixture containing 300 µL of the supernatants and 300 µL of 0.67% thiobarbituric acid in 7.1% sodium dodecyl sulfate was left in boiling water bath for 25 min. The mixture was allowed to cool on water for 5 min. The resulting pink stained TBA-RS was determined in a spectrophotometer at 532 nm. CDME or CSH did not produce color when tested without the addition of the supernatant, demonstrating the absence of a direct reaction to thiobarbituric acid. Calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane and each curve point was subjected to the same treatment as that of the supernatants. TBA-RS was calculated as pmol of malondialdehyde formed per mg of protein.

2',7'-dihydrodichlorofluorescein (DCFH) oxidation

Oxygen and nitrogen reactive species production was assessed according to LeBel et al. [19] by using 2',7'-dihydrodichlorofluorescein diacetate (DCF-DA). H₂O₂-Fe²⁺-derived oxidant is mainly responsible for the nonenzymatic oxidation of DCFH. In

addition, peroxidase alone and oxidants formed during the reduction of H₂O₂ by peroxidase oxidize DCFH [19]. DCF-DA prepared in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 140 mM KCl was incubated with 100 μ L of supernatants during 30 min at 37 °C. DCF-DA is enzymatically hydrolyzed by intracellular esterases to form non-fluorescent DCFH, which is then rapidly oxidized to form highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) in the presence of reactive species. The DCF fluorescence intensity parallels to the amount of reactive species formed. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 480 nm and 535 nm, respectively. Calibration curve was performed with standard DCF (0.25–10 μ M) and the levels of reactive species were calculated as nmol of DCF formed per mg of protein.

Determination of carbonyls

Carbonyl protein content was determined by the method described by Reznick and Packer [20]. Carbonyls are formed by the oxidation of amino acids in proteins, or adducts formed with the products of lipoperoxidation, mainly 4-hydroxy-2-nonenal (HNE). Histidine, arginine and lysine are the main target amino acids for carbonylation [21]. Briefly, 200 μ L supernatant of each sample, and 400 μ L of 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) or 400 μ L 2 mM HCl were incubated at room temperature for 1 h in a dark ambient. After incubation, 0.5 mL of 20% TCA was added and centrifuged at 10,000 x g for 3 minutes. Next, the protein pellet was washed two times with 1 mL of ethyl acetate/ethanol 1:1 (v/v) and suspended in 0.6 mL 6 mol/L guanidine and kept at 60 °C for 15 min. After centrifugation at 10,000 x g for 3 min, each sample was read at 370 nm and total carbonylation calculated using a molar extinction coefficient of 22,000 M⁻¹cm⁻¹, as described by Levine et al. [22]. Results are expressed as nmol of carbonyls formed per mg of protein.

Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD is responsible for dismutation of superoxide anions, forming hydrogen peroxide (H_2O_2). Superoxide anions react with Fe-S-Enzymes, phenoxyls and nitric oxide. SOD activity, including cytosolic Cu-Zn-SOD, and mitochondrial Mn-SOD, was determined using the RANSOD kit (Randox, Antrim, United Kingdom). The method is based on the formation of red formazan from the reaction of 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride and superoxide radical (produced in the incubation medium from the xanthine–xanthine oxidase reaction system), which is assayed spectrophotometrically at 505 nm. The inhibition of the chromogen production is proportional to the activity of the SOD present in the sample. A 50% inhibition is defined as 1 U of SOD and the specific activity is represented as units per milligram of protein.

Catalase (CAT) activity

CAT is responsible for transformation of H_2O_2 in H_2O . Hydrogen peroxide can react with thiol and methionyl groups of enzymes and other proteins, and form the high reactive hydroxyl free radical. CAT activity was assayed according to Aebi [23] by measuring the absorbance decrease at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H_2O_2 , 0.1% Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and 10 μ L supernatants. One unit (U) of the enzyme is defined as one μ mol of H_2O_2 consumed per minute and the specific activity was expressed as μ mol of H_2O_2 consumed per minute per mg of protein.

Glutathione peroxidase (GPx) activity

GPx activity was measured according to Wendel [24] using tert-butylhydroperoxide as substrate. The enzyme activity was determined by monitoring the NADPH disappearance at 340 nm in a medium containing 100 mM potassium phosphate

buffer / ethylenediaminetetraacetic acid 1 mM, pH 7.7, 2 mM, glutathione, 0.15 U / mL glutathione reductase, 0.4 mM azide, 0.5 mM tert-butyl-hydroperoxide, 0.1 mM NADPH and 10 μ L supernatants. One GPx unit (U) is defined as one μ mol of NADPH consumed per minute. The specific activity was expressed as μ mol of NADPH consumed per minute per mg of protein.

Protein determination

The protein content was determined by the method of Lowry et al. [25] using bovine serum albumin as the standard. CDME and CSH did not interfere in the reaction.

Statistical analysis

Data from weight of the animals were analyzed by repeated measures ANOVA followed by the Tukey test when the *F* value was significant. Data from the parameters of oxidative stress were analyzed by three-way ANOVA (presence or absence of CDME; presence or absence of CSH; time of sacrifice). Post hoc analysis of a significant interaction was performed by one-way ANOVA followed by the Tukey test when the *F* value was significant when required. All data were analyzed by the Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS 12.0 for Windows) [26].

Results

Analysis of the body weight of the rats by repeated measures showed a significant between-subject effect ($F(3,53) = 3.82$; $p < 0.01$). Body weight did not differ between groups at the beginning of the treatment ($F(3,53) = 0.216$; $p > 0.80$), but CDME-treated group presented a significant weight deficit after six days of treatment ($F(3, 53) = 3.11$; $p < 0.05$), similar to the poor development observed in cystinotic children. Co-administration of CSH prevented the poor rat development caused by CDME loading (Figure 1).

Univariate F-tests for CDME by CSH interaction showed that co-administration of CSH prevented the effect of CDME on TBA-RS ($F(1,48) = 18.53$; $p < 0.001$), carbonyl content of proteins ($F(1,48) = 6.28$; $p < 0.05$), DCFH oxidation ($F(1,48) = 32.67$; $p < 0.001$), CAT activity ($F(1,48) = 4.01$; $p < 0.05$), GPx activity ($F(1,48) = 33.81$; $p < 0.001$), and SOD activity ($F(1,48) = 4.49$; $p < 0.05$). Univariate F-tests for CDME by time interaction showed that the effect of CDME administration was independent of the time of animal sacrifice for TBA-RS ($F(1,48) = 0.42$; $p > 0.52$), carbonyl content of proteins ($F(1,48) = 1.67$; $p > 0.2$), DCFH oxidation ($F(1,48) = 0.37$; $p > 0.54$), and GPx activity ($F(1,48) = 2.57$; $p < 0.15$), whereas it was dependent for CAT activity ($F(1,48) = 12.64$; $p < 0.001$), and SOD activity ($F(1,48) = 5.81$; $p < 0.05$). Post hoc comparison between means indicates that CDME administration increased TBA-RS, carbonyl content of proteins, DCFH oxidation, and GPx activity, independently of the time of animal sacrifice, and co-administration of CSH prevented this increase (Figures 2, 3, 4, 5). On the other hand, in the rats receiving CDME administration, CAT activity was reduced 1h after treatment, and increased after 12h. Co-administration of CSH prevented the increase, but not the decrease of CAT activity (Figure 6). It can be seen in figure 7 that SOD activity did not change in rats receiving CDME and sacrificed after 1h, but increased after 12h. Co-administration of CSH did not change SOD activity after 1h, but prevented the increase caused by CDME administration after 12h.

Taken together, these results suggest that CDME administration induces the formation of superoxide anions, hydrogen peroxide and hydroxyl free radicals, leading to lipoperoxidation, protein carbonylation, and stimulation of SOD, GPx and CAT activities. Moreover, CSH probably acts as a scavenger of free radicals, preventing, at least in part, the effects of CDME.

Discussion

In the present work we investigated the effects of the administration of CDME, CSH or CDME + CSH on various parameters of oxidative stress in the kidney of young rats. We observed that CDME administration induces lipoperoxidation, protein carbonylation, and stimulates SOD, GPx and CAT activities, probably through the formation of superoxide anions, hydrogen peroxide, and hydroxyl anions. Besides, CSH prevented, at least in part, the effects of CDME, possibly acting as a scavenger of superoxide anions and hydrogen peroxide.

Thiols like CSH are potential physiologic targets for both superoxide and hydrogen peroxide, and they are more reactive with each oxidant when fully ionized. Scavenging of superoxide is followed by thiol oxidation and can deplete defenses against other oxidants, or shift the redox balance toward a more oxidized status [27]. The shift of the redox balance may be harmful, because the intracellular redox state may determine whether a substance may act as antioxidant or pro-oxidant [28]. In the present investigation, lack of antioxidant effect of CSH in some measures could also be due to the thiol oxidase activity of Cu,Zn-SOD. This enzyme promotes oxidation of thiols with consequent formation of hydrogen peroxide [29].

In the present work, one hour after the last injection, SOD activity was normal and CAT activity was reduced, possibly because superoxide radicals inhibit this enzyme activity [30]. Twelve hours after the last administration, the two enzyme activities were increased. It is possible that the increase of SOD activity, eliminating superoxide radicals, could be responsible, at least in part, for the increase of CAT activity.

The major cellular thiol/disulfide systems, including GSH/GSSG and cysteine/cystine, are not in redox equilibrium and respond differently to chemical toxicants and physiologic stimuli [31]. Furthermore, *in vitro* studies show that variation in cysteine/cystine redox over the range found *in vivo* affects signaling pathways, which

control cell proliferation and oxidant-induced apoptosis. The results point to the conclusion that free radical scavenging antioxidants are of increased importance when thiol/disulfide redox states are oxidized. Therefore, thiol/disulfide redox states, per se, function in redox signaling and control as well as antioxidant protection [32].

Oxidative stress has been associated with apoptosis in several kidney diseases [33-37]. The cysteine/cystine couple provides a means to oxidize proteins without direct involvement of more potent oxidants [38]. HNE, a product of lipoperoxidation, triggers oxidative stress-linked apoptotic cell death through activation of the caspase cascade [39]. Under conditions of hydrogen peroxide delivery that mimic in vivo situations, the oxidative event that triggers the induction of apoptosis by H₂O₂ is a Fenton-type reaction and is independent of the thiol or selenium states of the cell [40].

Impairment of a lysosomal function may affect apoptosis even if lysosomal pathways per se do not play an essential role in mediating the execution of the cell-death program, they may contribute to the general phenomenon by amplifying the process. Indeed, loss of cell integrity for whatever reason should lead to chaotic disruption of lysosomes and release of their contents, thus exacerbating loss or degradation of components essential for survival [41]. On the other hand, mitochondrial membrane permeabilization (MMP) is likely to be indispensable for cell death initiated at lysosomal level, indicating that MMP constitutes a central event in the death-inducing signaling cascade [42]. Lysosomal membrane permeabilization has been suggested for cystine liberation during the initial step of apoptosis [11], inducing the activation of the proapoptotic PKC delta through cysteinylolation of the enzyme [43]. Besides, oxidative stress induces the formation of protein-mixed disulfides with low-molecular-weight thiols [44].

Although tissue damage in cystinosis might depend on cystine accumulation, the mechanisms of cystine toxicity are still unclear. Mice lacking cystinosin accumulate cystine in lysosomes but do not develop Fanconi syndrome [45], suggesting that cystine

must leave the lysosomes for tissue damage, in agreement with the observation that large lysosomal accumulation of cystine is found in apparently normal functioning cells. One possibility to explain how cystine could leave lysosomes and act into other cell compartments is the egress of cystine from lysosomes by secretion, followed by cystine transport back into the cytosol. Recent experiments with fibroblasts from cystinotic patients suggest that lysosomal cystine accumulated can be released during the early permeabilization phase of lysosomes in apoptosis [46]. Apoptosis was also induced in cultured human retinal pigment epithelial cells by incubating with cystine [47]. In addition, supplementation of creatine, a potent antioxidant [48], to the diet of mice fully prevents the apoptosis induced by TNF α [49]. On the other hand, in other genetic (tyrosinemia, galactosemia, cytochrome C oxidase deficiency) and acquired (heavy metals, drugs, maleate) causes of Fanconi syndrome, the accumulated toxic substances cause energy deficit and oxidative stress [50]. If oxidative stress occurs in patients with cystinosis, the supplementation of antioxidants together with CSH administration could help the prevention of tissue damage. However, it must be emphasized that in cystinosis the cystine accumulates in the lysosomes de novo, not by transiting and flooding the cytosol as is the case in the CDME model, hence a steady state oxidant challenge does not occur in cystinotic tissue unless the lysosomal cystine is released. Then it is probably a very small amount, compared to cellular GSH, based on lysosomal volume and cystine solubility. Considering the limitations of CDME model of cystinosis, further studies are necessary to evaluate the occurrence of oxidative stress and apoptosis in the tissues of patients affected by cystinosis.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq-Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS, RS-Brazil) and Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX-CNPq /FAPERGS -Brazil).

References

- [1] Town M, Jean G, Cherqui S, Attard M, Forestier L, Whitmore S, Callen D, Gribouval O, Broyer M, Bates G, van't Hoff W, Antignac C (1998) A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet* 18: 319-324.
- [2] Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA (2002) Cystinosis. *N Engl J Med* 347:111-121.
- [3] Foreman JW, Bowring MA, Lee J, States B, Segal S (1987) Effect of cystine dimethyl ester on renal solute handling and isolated renal tubule transport in the rat. A new model of the Fanconi syndrome, *Metabolism-clinical and experimental*. 36:1185-1191.
- [4] Foreman JW, Benson L (1990) Effect of cystine loading and cystine dimethyl ester on renal brushborder membrane-transport. *Bioscience Reports* 10: 455-459.
- [5] Foreman, Benson LL, Wellons M, Avner ED, Sweeney W, Nissim L, Nissim I (1995) Metabolic studies of rat renal tubule cells loaded with cystine: the cystine dimethyl ester model of cystinosis *J Am Soc Nephrol* 6: 269-272.
- [6] Salmon RF, Baum M (1990) Intracellular cystine loading inhibits transport in the rabbit proximal convoluted tubule, *J Clin Invest* 85: 340-344.
- [7] Ben-Nun A, Bashan N, Potashnik R, Cohen-Luria R, Moran A (1993) Cystine loading induces Fanconi's syndrome in rats: in vivo and vesicle studies. *Am J Physiol* 265: 839-844.
- [8] Coor C, Salmon RF, Quigley R, Marver D, Baum M (1991) Role of adenosine-triphosphate (ATP) and Na^+ , K^+ -ATPase in the inhibition of proximal tubule transport with intracellular cystine loading. *J Clin Invest* 87: 955-961.
- [9] Wilmer MJ, de Graaf-Hess A, Blom HJ, Dijkman HB, Monnens LA, van den Heuvel LP, Levtchenko EM (2005) Elevated oxidized glutathione in cystinotic proximal tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 337: 610-614.

- [10] Laube GF, Shah V, Stewart VC, Hargreaves IP, Haq MR, Heales SJ, van't Hoff WG (2006) Glutathione depletion and increased apoptosis rate in human cystinotic proximal tubular cells. *Pediatr Nephrol* 21: 503-509.
- [11] Park MA, Helip-Wooley A, Thoene J (2002) Lysosomal cystine storage increases apoptosis in cultured human fibroblasts and renal proximal tubule epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 13: 2878–2887.
- [12] Corcoran GB, Fix L, Jones DP, Moslen MT, Nicotera P, Oberhammer FA, Buttyan R (1994) Apoptosis: molecular control point in toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 128: 169-178.
- [13] Cantoni O, Brandi G, Albano A, Cattabeni F (1995) Action of cystine in the cytotoxic response of *Escherichia coli* cells exposed to hydrogen peroxide. *Free Radic Res* 22: 275-83.
- [14] Levtschenko E, Graaf-Hess A, Wilmer AM, van der Heuvel L, Monnens L, Blom H (2005) Altered status of glutathione and its metabolites in cystinotic cells. *Nephrol Dial Transplant* 20:1828-1832.
- [15] Mannucci L, Pastore A, Rizzo C, Piemonte F, Rizzoni G, Emma F (2006) Impaired activity of the gamma-glutamyl cycle in nephropathic cystinosis fibroblasts. *Pediatr Res* 59: 332-335.
- [16] Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA (2001) Cystinosis: a disorder of lysosomal membrane transport, in: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, (Eds), *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*, 8th ed. McGraw- Hill, New York, pp 5085-5108
- [17] Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186: 407-21.
- [18] Kehrer JP (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149: 43–50.

- [19] LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5: 227-231.
- [20] Reznick AZ, Packer L (1994) Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233: 357–363.
- [21] Uchida K (2003) Histidine and lysine as targets of oxidative modification. *Amino Acids* 25: 249-57.
- [22] Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici I, Climent AG, Lenz BW, Ahn S, Stadtman ER. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186: 464–478.
- [23] Aebi H (1984) Catalase, in vitro, *Methods Enzymol* 105: 121-126.
- [24] Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77: 325-332.
- [25] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.
- [26] Leech NL, Barrett KC, Morgan GA (2005) SPSS for intermediate statistics. Use and interpretation, 2nd Ed., Lawrence Erlbaum Associates, Publishers, London, 2005, pp. 46-62.
- [27] Winterbourn CC, Metodiewa CD (1999) Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide *Free Radic Biol Med* 27: 322–328.
- [28] Rosenberg PA, Li Y, Ali S, Altiok N, Back SA, Volpe JJ (1999) Intracellular redox state determines whether nitric oxide is toxic or protective to rat oligodendrocytes in culture. *J Neurochem* 73: 476–484.
- [29] Winterbourn CC, Peskin AV, Parsons-Mair HN (2002) Thiol oxidase activity of copper, zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem* 277: 1906–1911.

- [30] Kono Y, Fridovich I (1982) Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 257: 5751-5754.
- [31] Jones DP (2006) Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8:1865-1879.
- [32] Jones DP (2006) Extracellular redox state: refining the definition of oxidative stress in aging. *Rejuvenation Res* 9: 169-81.
- [33] Xie J, Guo Q (2006) Apoptosis antagonizing transcription factor protects renal tubule cells against oxidative damage and apoptosis induced by ischemia-reperfusion. *Jam Soc Nephrol* 17: 3336-46.
- [34] Chevalier RL (2006) Pathogenesis of renal injury in obstructive uropathy. *Curr Opin Pediatr* 18: 153-60.
- [35] Xie J, Shaikh ZA (2006) Cadmium-induced apoptosis in rat kidney epithelial cells involves decrease in nuclear factor-kappa B activity. *Toxicol Sci* 91: 299-308.
- [36] Furfaro AL, Menini S, Patriarca S, Pesce C, Odetti P, Cottalasso D, Marinari UM, Pronzato MA, Traverso N (2005) HNE-dependent molecular damage in diabetic nephropathy and its possible prevention by N-acetyl-cysteine and olerutin. *Biofactors* 24: 291-298.
- [37] Susztak K, Raff AC, Schiffer M, Bottinger EP (2006) Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes* 55: 225-233.
- [38] Jones DP, Go YM, Anderson CL, Ziegler TR, Kinkade Jr JM, Kirilin WG (2004) Cysteine/cystine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologic redox signaling and control. *FASEB J* 18: 1246-1248.
- [39] Liu W, Kato M, Akhand AA, Hayakawa A, Suzuki H, Miyata T, Kurokawa K, Hotta Y, Ishikawa N, Nakashima I. (2000) 4-hydroxynonenal induces a cellular redox status-related activation of the caspase cascade for apoptotic cell death. *J Cell Sci* 113: 635-641.

- [40] Antunes F, Cadenas E (2001) Cellular titration of apoptosis with steady state concentrations of H₂O₂: submicromolar levels of H₂O₂ induce apoptosis through Fenton chemistry independent of the cellular thiol state. *Free Radic Biol Med* 30: 1008-1018.
- [41] Tardy C, Andrieu-Abadie N, Salvayre R, Levade T (2004) Lysosomal storage diseases: is impaired apoptosis a pathogenic mechanism? *Neurochem Res* 29: 871-880.
- [42] Boya P, Andreau K, Poncet D, Zamzami N, Perfettini JL, Metivier D, Ojcius DM, Jaattela M, Kroemer G (2003) Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. *J Exp Med* 197: 1323-1334.
- [43] Park MA, Pejovic V, Kerisit KG, Junius S, Thoene JG (2006) Increased apoptosis in cystinotic fibroblasts and renal proximal tubule epithelial cells results from cysteinylolation of protein kinase C (delta). *J Am Soc Nephrol* 17: 3167-3175.
- [44] Rokutan K, Johnston Jr., Kawai K (1994) Oxidative stress induces S-thiolation of specific proteins in cultured gastric mucosal cells. *Am J Physiol* 266: G247-254.
- [45] Cherqui S, Sevin C, Hamard G, Kalatzis V, Sich M, Pequignot MO, Gogat K, Abitbol M, Broyer M, Gubler MC, Antignac C (2002) Intralysosomal cystine accumulation in mice lacking cystinosin, the protein defective in cystinosis. *Mol Cell Biol* 22: 7622-7632.
- [46] Park MA, Thoene JG (2005) Potential role of apoptosis in development of the cystinotic phenotype. *Pediatr Nephrol* 20: 441-446.
- [47] Jiang S, Moriarty-Craige SE, Orr M, Cai J, Sternberg P, Jones DP (2005) Oxidant-induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells: dependence on extracellular redox state. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 1054-1061.
- [48] Sestili P, Martinelli C, Bravi G, Piccoli G, Curci R, Battistelli M, Falcieri E, Agostini D, Gioacchini AM, Stocchi V (2006) Creatine supplementation affords cytoprotection

in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 40: 837-849.

[49] Hatano E, Tanaka A, Kanazawa A, Tsuyuki S, Tsunekawa S, Iwata S, Ellerby LM, Bredesen D, Freeze H, Abrahamson M, Bromme D, Krajewski S, Reed JC, Yin XM, Turk V (2004) Inhibition of tumor necrosis factor-induced apoptosis in transgenic mouse liver expressing creatine kinase. *Liver Int* 24: 384-393.

[50] Bergeron M, Gougoux A, Noël J, Parent L (2001) The renal Fanconi syndrome, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, (Eds.), *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*, 8th ed., McGraw-Hill, New York 2001 pp. 5023-5038.

Figure 1. Effect of cystine dimethyl ester (CDME) and cysteamine (CSH) administration on body weight of the rats at the first and the sixth day of treatment. Data are mean \pm SD for 15 animals in each group. * $p < 0.05$ compared with the other groups at the sixth day of treatment (Tukey test).

Figure 2. Effect of cystine dimethyl ester (CDME) and cysteamine (CSH) administration on thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) in the kidney of rats. Data are mean \pm SD for 6-8 animals in each group. Animals were sacrificed in the sixth day of treatment 1 h or 12 h after the last injection. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared with the other groups of rats sacrificed at the same time (Tukey test).

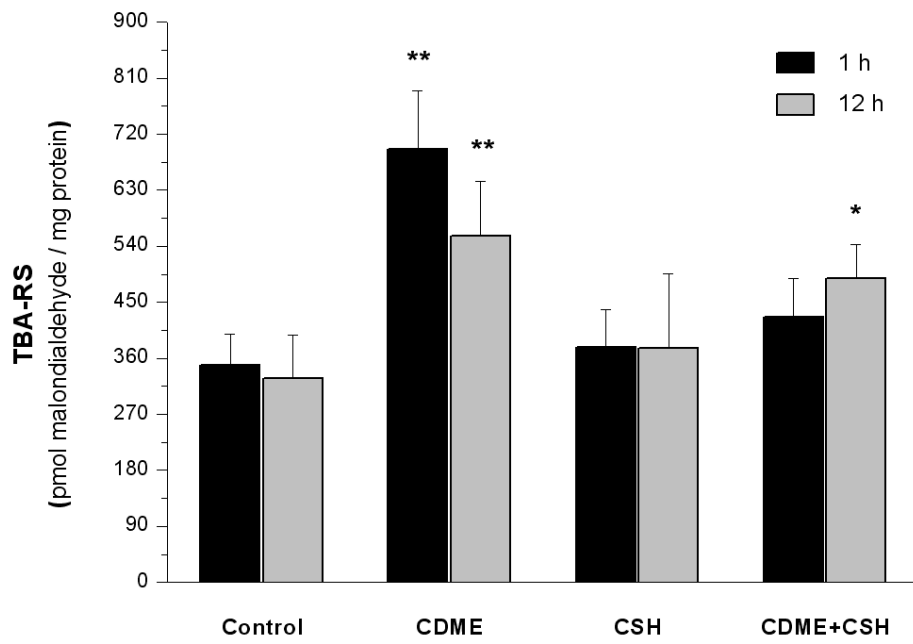
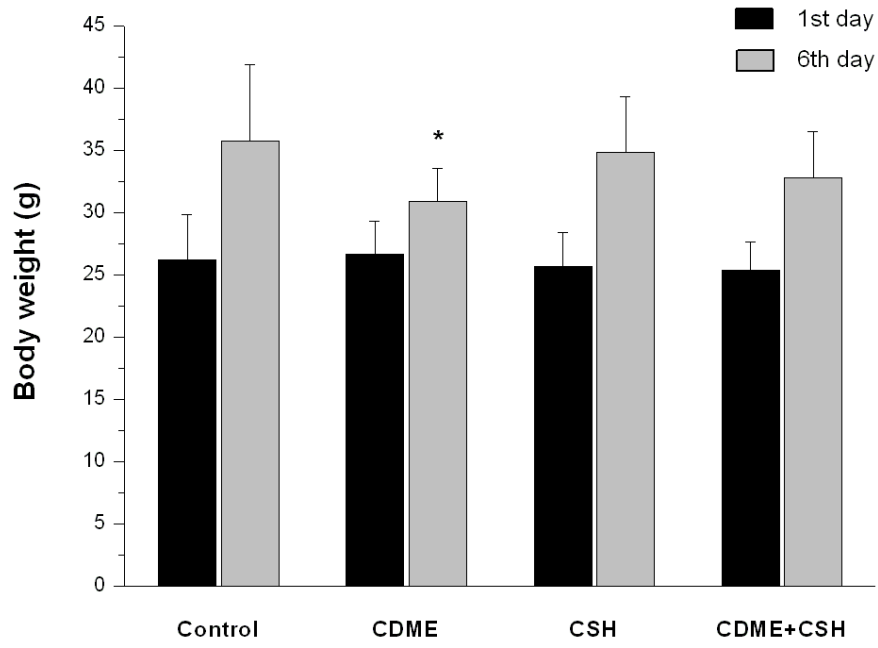
Figure 3. Effect of cystine dimethyl ester (CDME) and cysteamine (CSH) administration on oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH) in the kidney of rats. Data are mean \pm SD for 6-8 animals in each group. Animals were sacrificed in the sixth day of treatment 1 h or 12 h after the last injection. ** $p < 0.01$ compared with the other groups of rats sacrificed at the same time (Tukey test).

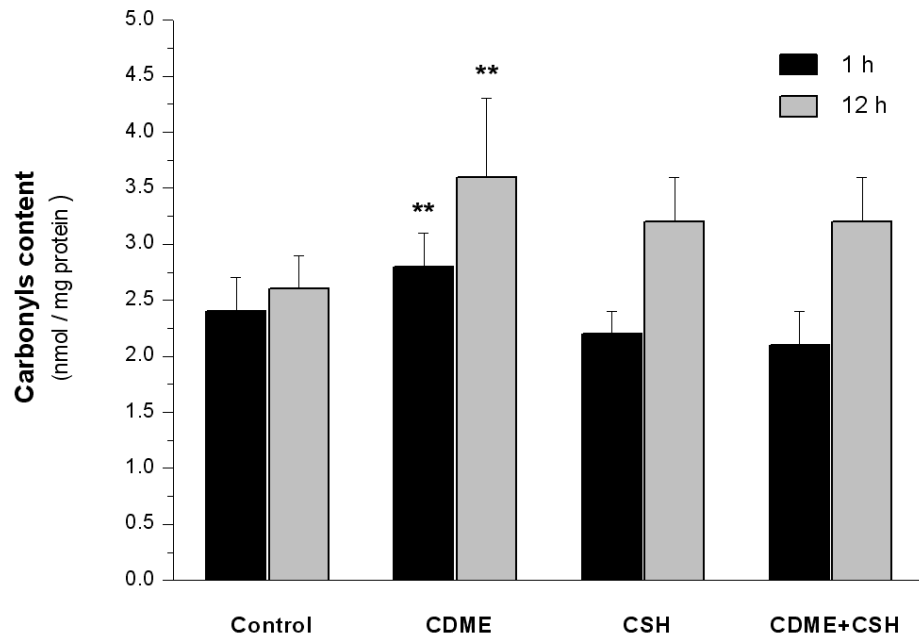
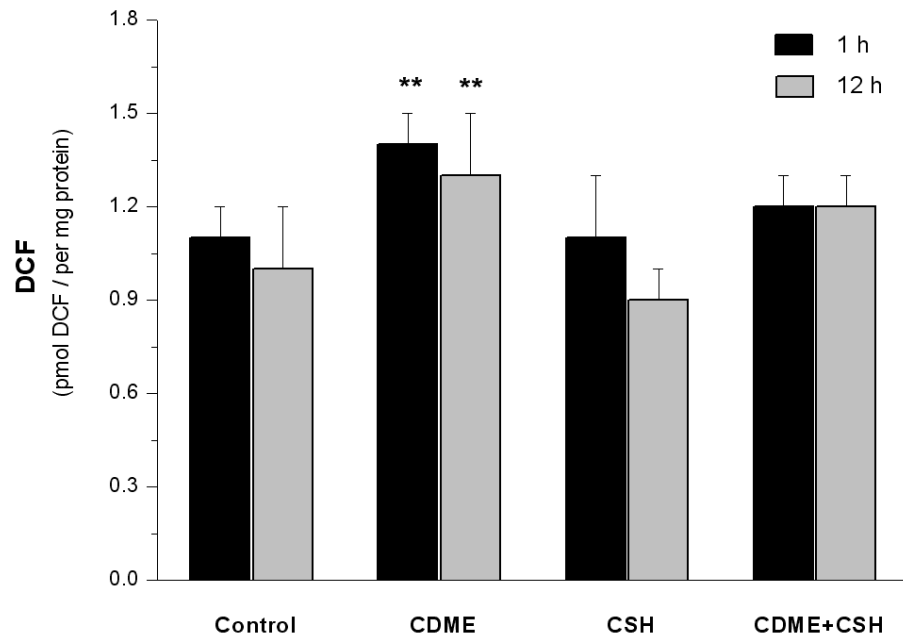
Figure 4. Effect of cystine dimethyl ester (CDME) and cysteamine (CSH) administration on carbonyls content in the kidney of rats. Data are mean \pm SD for 6-8 animals in each group. Animals were sacrificed in the sixth day of treatment 1 h or 12 h after the last injection. ** $p < 0.01$ compared with the other groups of rats sacrificed at the same time (Tukey test).

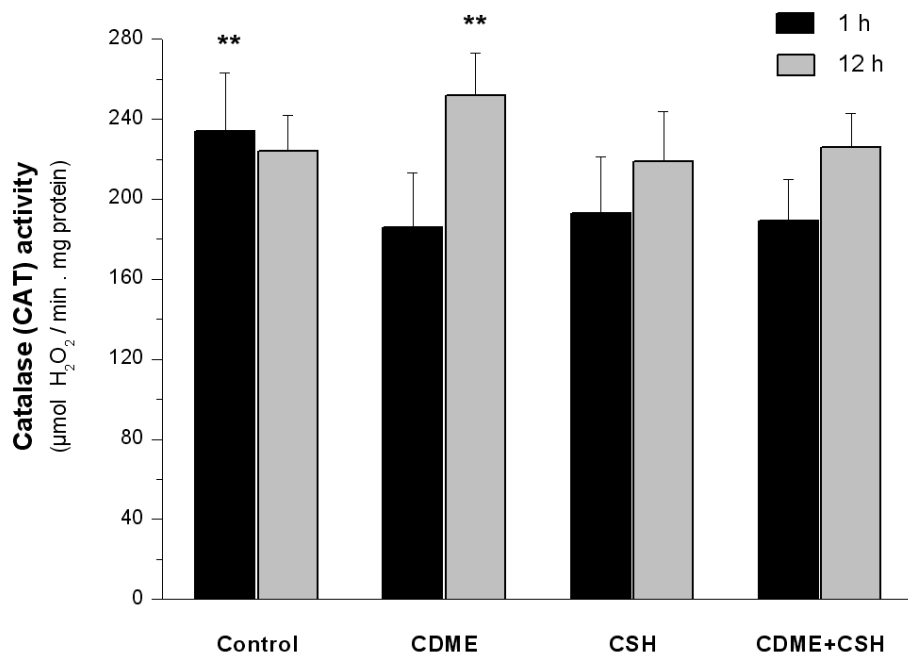
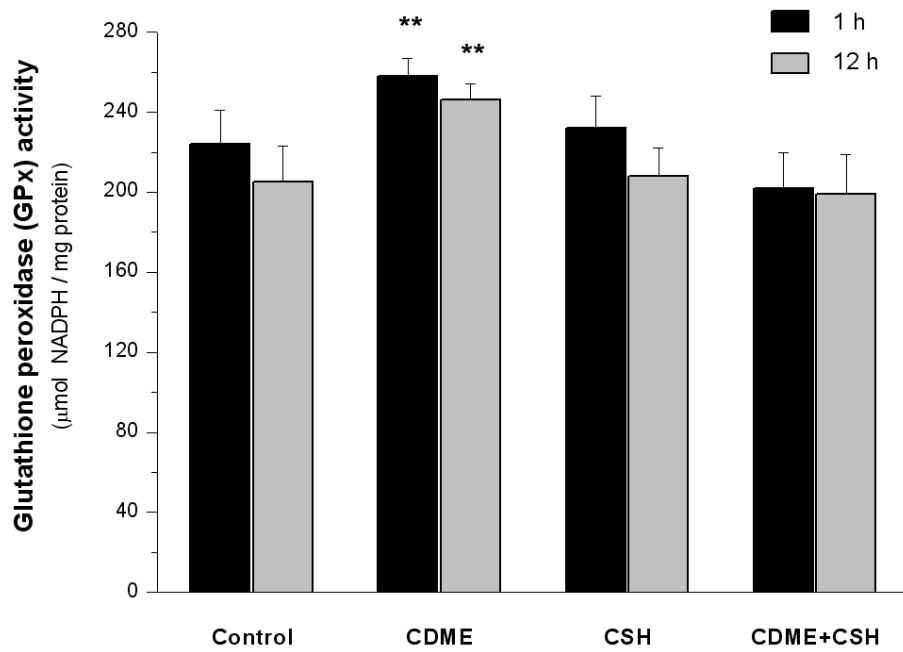
Figure 5. Effect of cystine dimethyl ester (CDME) and cysteamine (CSH) administration on the activity of glutathione peroxidase (GPx) in the kidney of rats. Data are mean \pm SD for 6-8 animals in each group. Animals were sacrificed in the sixth day of treatment 1 h or 12 h after the last injection. ** $p < 0.01$ compared with the other groups of rats sacrificed at the same time (Tukey test).

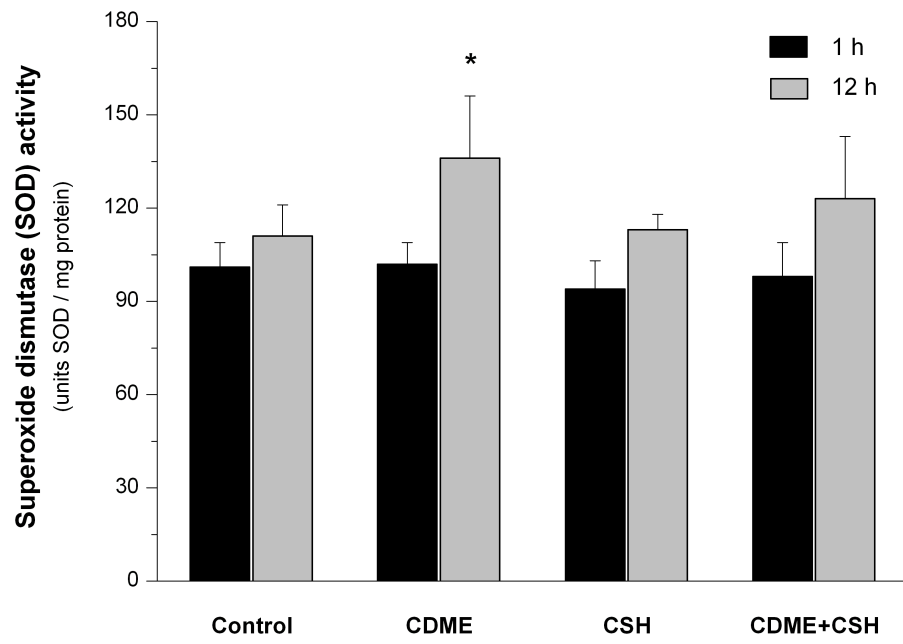
Figure 6. Effect of cystine dimethyl ester (CDME) and cysteamine (CSH) administration on the activity of catalase (CAT) in the kidney of rats. Data are mean \pm SD for 6-8 animals in each group. Animals were sacrificed in the sixth day of treatment 1 h or 12 h after the last injection. ** $p < 0.01$ compared with the other groups of rats sacrificed at the same time (Tukey test).

Figure 7. Effect of cystine dimethyl ester (CDME) and cysteamine (CSH) administration on the activity of superoxide dismutase (SOD) in the kidney of rats. Data are mean \pm SD for 6-8 animals in each group. Animals were sacrificed in the sixth day of treatment 1 h or 12 h after the last injection. * $p < 0.05$ compared with the other groups of rats sacrificed at the same time (Tukey test).









IV – DISCUSSÃO

A cistinose nefropática é uma doença autossômica recessiva caracterizada por um defeito no transporte de cistina para fora dos lisossomos, levando a um acúmulo deste dissulfeto nos lisossomos da maioria dos tecidos (Gahl et al, 2001). O acúmulo de cistina leva à insuficiência renal nas crianças afetadas que não forem tratadas precocemente com cisteamina (Schneider et al, 1995), um aminotiol capaz de diminuir os depósitos de cistina (Gahl et al, 1992)). Estudos histopatológicos mostraram uma correlação temporal entre o acúmulo de cistina, alterações morfo-funcionais dos túbulos renais proximais e o desenvolvimento da Síndrome de Fanconi (Mahoney e Striker, 2000).

Algumas enzimas que contêm grupos tiólicos em sua estrutura podem ter suas atividades alteradas pela troca entre seus grupos tiólicos e dissulfetos como a cistina (Gilbert, 1984). A creatinaquinase (CK, EC 2.7.3.2) e a piruvatoquinase (PK) (ATP:piruvato 2-O-fosfotransferase, EC 2.7. 1. 40) são duas enzimas tiólicas críticas para a homeostasia energética de quase todos os tecidos. A PK catalisa uma etapa crítica para o metabolismo da glicose, provendo energia para o funcionamento normal do cérebro e do rim, entre outros órgãos. A isoforma M1, abundante no cérebro e no rim, e a isoforma M2, abundante no rim, são produzidas pelo mesmo gene e apresentam estrutura tetramérica, grupos tiólicos necessários para seu funcionamento normal e comportamento enzimático semelhantes (Hall e Cottam, 1978). O piruvato, um dos produtos da ação da PK, pode formar acetil-CoA para prover energia, ou agir como antioxidante, protegendo as células por meio de ambas ações (Das, 2006; Berry e Toms, 2006). A CK catalisa a transferência reversível do grupo fosforila da fosfocreatina para o ADP formando ATP e creatina. A CK exerce um papel crítico na manutenção da homeostasia energética, principalmente para aqueles tecidos que necessitam de altas demandas de energia em momentos críticos, tais como tecido nervoso e muscular (Wallimann et al, 1992) As isoenzimas da CK estão compartimentalizadas estrategicamente nos locais de liberação e captação de energia

(mitocôndria) e de utilização da mesma (citosol), servindo como um verdadeiro transportador de fosforilas desde a mitocôndria até o citosol (Wallimann et al, 1992). O rim e o cérebro contêm as isoenzimas BB-CK citosólica e Mi-CK mitocondrial. No rim, estas enzimas estão localizadas nas regiões cortical e medular externa, possivelmente atuando no transporte de sódio (Wallimann et al, 1992). Em células renais humanas, a sobrecarga com CDME inibe os transportes dependentes de sódio, o que pode estar associado a uma inibição da CK (Çcetinkaya et al, 2002). A creatina, além de fazer parte da homeostasia energética, tem importante ação antioxidante (Hatano et al, 2004; Sestili et al, 2006).

O estresse oxidativo tem sido associado à apoptose (Corcoran et al, 1994), sendo que a cistina aumenta a resposta citotóxica de bactérias ao peróxido de hidrogênio, possivelmente por meio de uma troca entre grupos tiólicos e dissulfetos na membrana bacteriana (Cantoni et al, 1995). Foi observado um aumento da relação GSSG/ GSH (%) em células de pacientes cistinóticos, sugerindo um aumento de estresse oxidativo (Levtchenko et al, 2005; Laube et al, 2006). É possível que diante de situações de grande demanda de energia, ou de estresse oxidativo, as células cistinóticas apresentem depleção de GSH (Wilmer et al, 2005; Levtchenko et al, 2005; Mannucci et al, 2006).

Modelos animais de cistinose têm sido desenvolvidos por meio de “knock out” (Cherqui et al, 2002) ou por meio de sobrecarga de lisossomos por CDME (Foreman et al, 1987; Bem-Nun et al, 1993; Çcetinkaya et al, 2002). Os camundongos “knock out” com ausência de cistinosina acumulam a cistina, mas não desenvolvem síndrome de Fanconi, sugerindo que o acúmulo lisossomal de cistina por si só seja insuficiente para provocar dano celular. A sobrecarga com CDME tem sido usada para tentar esclarecer os mecanismos que levam o acúmulo de cistina a provocar dano celular. A sobrecarga de túbulos renais proximais com CDME provoca um déficit de reabsorção de água, eletrólitos, aminoácidos e glicose semelhante ao observado na síndrome de Fanconi, possivelmente por redução de ATP e da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase (Foreman et al, 1987; Foreman e

Benson, 1990; Salmon e Baum, 1990; Coor et al, 1991; Bem-Nun et al, 1993; Foreman et al, 1995). No entanto, estudos recentes contestam esta explicação, sugerindo que outros mecanismos devam estar associados à redução da atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase (Wilmer et al, 2005; Laube et al, 2006). Esta enzima é bastante sensível ao estresse oxidativo, o que poderia explicar a maior suscetibilidade das células cistinóticas a desenvolver apoptose mesmo com a capacidade mitocondrial geradora de energia normal (Park et al, 2002).

Portanto, os mecanismos pelos quais a cistina acumulada nos lisossomos leva ao dano celular na cistinose ainda são controversos. Com o objetivo de contribuir para a compreensão destes mecanismos foram realizados 3 grupos de experimentos em ratos Wistar jovens:

1- Efeitos in vivo e in vitro da cistina, CSH e da associação de ambas sobre a atividade da enzima tiólica CK das frações citosólica e mitocondrial de rim (artigo 1);

2- Efeitos da administração de CDME, CSH e associação de CDME com CSH sobre as atividades das enzimas tiólicas PK e CK de rim e de córtex cerebral, além da atividade da LDH, uma enzima não tiólica (artigo 2);

3- Efeitos da administração de CDME, CSH e associação de CDME com CSH sobre vários parâmetros de estresse oxidativo em rim (artigo 3).

Os resultados obtidos com estes 3 grupos de experimentos permitiram acrescentar algum conhecimento à controvérsia sobre os mecanismos patogênicos na cistinose.

1- Efeitos in vivo e in vitro da cistina, CSH e da associação de ambas sobre a atividade da enzima tiólica CK das frações citosólica e mitocondrial de rim (artigo 1).

Os resultados mostraram que a administração de cistina reduziu a atividade da CK nas frações citosólica e mitocondrial e a co-administração de CSH preveniu esta redução. Além disso, a adição de GSH ao ensaio enzimático reverteu a redução da atividade, sugerindo uma inibição reversível, possivelmente sobre os grupos tiólicos essenciais da

enzima. Os estudos *in vitro* mostraram que a inibição da enzima era do tipo não-competitivo em relação aos substratos ADP e fosfocreatina, dependente do tempo de pré-incubação e da concentração de cistina no ensaio enzimático, além de poder ser prevenida e revertida pela adição de CSH ao ensaio.

Estes resultados são compatíveis com a hipótese de que a cistina pode inibir a CK por alteração dos seus grupos tiólicos essenciais. Com o objetivo de testar esta hipótese, foi realizado o segundo experimento, utilizando a sobrecarga lisossomal de CDME e a avaliação de seu efeito não apenas sobre a atividade da CK em rim, mas também sobre a atividade de outra enzima tiólica, a PK, e de uma enzima não tiólica, a LDH. Além disso, a atividade destas 3 enzimas foi medida também no córtex cerebral, para evidenciar se o efeito sobre elas ocorria em outro tecido afetado pela doença..

2- Efeitos da administração de CDME, CSH e associação de CDME e de CSH sobre as atividades das enzimas tiólicas PK e CK de rim e de córtex cerebral, além da atividade da LDH, uma enzima não tiólica (artigo 2).

Os resultados evidenciaram que a administração de CDME, sobrecarregando os lisossomos renais e corticais cerebrais, reduziu as atividades das enzimas tiólicas PK e CK de ambas frações, em ambos tecidos, e que a co-administração de CSH preveniu estes efeitos. Além disso, a LDH, uma enzima desprovida de grupos tiólicos essenciais, não foi afetada pela sobrecarga de CDME. Também foi observado que a administração de CDME reduziu a relação entre tiois e dissulfetos e que a administração de CSH restabeleceu a normalidade desta relação.

Estes resultados, juntamente com os anteriores, reforçam a hipótese de que a inibição de enzimas tiólicas pode ser um dos mecanismos pelos quais a cistina pode causar dano aos tecidos. Além disso, considerando a reversibilidade da inibição enzimática por GSH e CSH, pode-se presumir que a cistina possa induzir estresse oxidativo, por meio do

qual provoque oxidação dos grupos tiólicos destas e de outras enzimas e proteínas. Para testar esta hipótese foi realizado o terceiro grupo de experimentos.

3- Efeitos da administração de CDME, CSH e associação de CDME e de CSH sobre vários parâmetros de estresse oxidativo em rim (artigo 3).

Os resultados indicaram que a administração de CDME foi capaz de induzir lipoperoxidação, carbonilação de proteínas e estimulação da atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx e CAT, provavelmente por meio da indução de peróxido de hidrogênio e de ânions superóxido e hidroxila, já que houve aumento da oxidação do DCFH. Além disso, a co-administração de CSH preveniu parte destes efeitos, sugerindo que este aminotiol possa agir como “scavenger” de ânions peróxido e de peróxido de hidrogênio.

Portanto, considerando os resultados obtidos nos 3 grupos de experimentos, é possível levantar a hipótese de que a cistina, ao ser liberada de seu depósito lisossomal, induza a formação de radicais livres capazes de provocar lipoperoxidação, carbonilação de proteínas e oxidação de grupos tiólicos, entre outros efeitos não testados, levando ao dano celular, possivelmente por apoptose.

A apoptose pode ser induzida em células retinianas por incubação com cistina (Jiang et al, 2005). A inibição da PK pode reduzir o conteúdo celular de piruvato, reduzindo não só a liberação e captação de energia, como também a atividade de “scavenger” de espécies ativas exercida pelo piruvato, ambas condições favoráveis ao desencadeamento da apoptose (Das, 2006; Berry e Toms, 2006). A inibição da CK, da mesma forma, reduz a homeostasia energética e a concentração de creatina, também um potente antioxidante (hatano et al, 2004; Sestili et al, 2006). A inibição de outras enzimas tiólicas ampliaria este processo de redução da disponibilidade energética, indução de estresse oxidativo e desencadeamento de morte celular.

Os principais sistemas celulares tiol/dissulfeto, GSH/GSSG e cisteína/cistina não estão em equilíbrio redox e respondem individualmente aos estímulos fisiológicos e substâncias tóxicas (Jones, 2006). Variações do sistema redox cisteína/cistina acima dos valores normais afetam vias de sinalização que controlam a proliferação celular e a apoptose induzida por oxidantes (Jones 2006a). O próprio sistema redox cisteína/cistina pode oxidar proteínas sem o envolvimento direto de outros oxidantes mais potentes (Jones et al, 2004).

O estresse oxidativo tem sido associado à apoptose em vários distúrbios renais (Furfaro et al, 2005; Xie e Guo, 2006; Chevalier, 2006; Xie e Shaikh, 2006; Susztak et al, 2006). Em outras causas genéticas (tirosinemia, galactosemia, deficiência de citocromo C oxidase) e adquiridas (intoxicações por metais pesados, drogas) de síndrome de Fanconi, as substâncias tóxicas acumuladas causam déficit de energia e estresse oxidativo (Bergeron et al, 2001).

A permeabilização da membrana mitocondrial (MMP) parece ser indispensável para a morte celular iniciada ao nível dos lisossomos, indicando que a MMP exerce um papel central na cascata de sinalização que leva à morte celular (Boya et al, 2003). A permeabilização da membrana lisossomal durante as fases iniciais da apoptose foi sugerida como forma de liberação da cistina acumulada, a qual exerceria sua ação nos outros compartimentos celulares, principalmente por cisteinilação de proteínas (Park et al, 2006). Atualmente há uma tendência crescente a aceitar a hipótese de que a cistina necessita sair dos lisossomos para desencadear o processo de morte celular.

V – CONCLUSÕES

Objetivo 1 - Determinar os efeitos in vitro e in vivo da cistina e/ou da cisteamina sobre a atividade da creatinaquinase em frações mitocondrial e citosólica de rim de ratos Wistar jovens, e caracterizar o tipo de inibição causada pela cistina.

Conclusões

- 1- A administração de cistina reduziu a atividade da creatinaquinase nas frações mitocondrial e citosólica, e a co-administração de cisteamina preveniu esta inibição;
- 2- A adição de glutathione reduzida ao ensaio da creatinaquinase reverteu a inibição causada pela administração de cistina;
- 3- A cistina inibiu a atividade da creatinaquinase nas frações mitocondrial e citosólica de um modo dependente de concentração e de tempo, e a adição de cisteamina ao ensaio reverteu e preveniu esta inibição;
- 4- Os estudos de competição entre cistina e os substratos da creatinaquinase ADP e fosfocreatina mostraram um padrão não competitivo;
- 5- Os valores de K_i para a inibição da creatinaquinase nas frações mitocondrial e citosólica foram pelo menos 10 vezes menores do que as concentrações de cistina observadas no rim de pacientes cistinóticos.

Objetivo 2 - Investigar o efeito da administração do dimetil cistina éster e/ou cisteamina sobre as atividades da piruvatoquinase em fração citosólica e da creatinaquinase nas frações mitocondrial e citosólica de rim e de cérebro de ratos Wistar jovens.

Conclusões

- 1- A administração dimetil cistina éster reduziu a atividade das enzimas tiólicas piruvatoquinase na fração citosólica e da creatinaquinase nas frações mitocondrial e citosólica, tanto no rim quanto no córtex cerebral dos ratos, e a co-administração de cisteamina preveniu esta inibição;
- 2- A atividade da lactato desidrogenase, uma enzima não-tiólica, não foi alterada pela administração do dimetil cistina éster e/ou de cisteamina;
- 3- A administração do dimetil cistina éster diminuiu a relação tiol/dissulfeto e a co-administração de cisteamina preveniu esta diminuição.

Objetivo 3 - Determinar o efeito da administração do dimetil cistina éster e/ou cisteamina sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em rim de ratos Wistar jovens.

Conclusões

- 1- A administração do dimetil cistina éster aumentou as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), a carbonilação de proteínas e a oxidação da 2',7'-diidrodiclorofluoresceína (DFCH), sugerindo a indução de formação de peróxido de hidrogênio e de anions superóxido e hidroxila, levando à lipoperoxidação e à carbonilação de proteínas;
- 2- A atividade da superóxido dismutase (SOD) aumentou no rim de ratos somente 12 h após a última injeção do dimetil cistina éster, sugerindo a formação de radicais superóxido com estimulação da atividade da enzima;
- 3- A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) diminuiu no rim de ratos 1h após a última injeção do dimetil cistina éster, e aumentou após 12h, sugerindo que a enzima seja inibida inicialmente pelos radicais superóxido, aumentando posteriormente por um efeito rebote;
- 4- A atividade da catalase (CAT) aumentou no rim dos ratos que receberam o dimetil cistina éster, sugerindo a formação de peróxido de hidrogênio com estimulação da atividade da enzima;
- 5- A co-administração de cisteamina preveniu os efeitos do dimetil cistina éster, sugerindo que este aminotiol possa agir como “scavenger” de radicais livres, especialmente anions superóxido e hidroxila.

Conclusão geral

A cistina é um potente inibidor *in vitro* e *in vivo* das enzimas tiólicas. Na forma do dimetil cistina éster, a cistina se acumula nos lisossomos, induz a formação de radicais livres, e inibe a atividade de enzimas tiólicas, o que poderia ocasionar alteração do metabolismo energético e indução de morte celular programada. A cisteamina, uma substância utilizada nos pacientes cistinóticos para remover a cistina acumulada nos lisossomos, previne os efeitos dos radicais livres formados e a inibição das enzimas tiólicas. Se estes efeitos da cistina observados nos animais também ocorrerem nos pacientes cistinóticos, é possível que a suplementação de creatina e de outros antioxidantes, tais como vitaminas E e C, possa ser benéfica aos pacientes como coadjuvante ao uso de cisteamina.

VI – PERSPECTIVAS

Esse trabalho abre oportunidades para novos estudos, tais como:

1 - Investigar o efeito da administração de antioxidantes em ratos submetidos à sobrecarga de dimetil cistina éster e/ou cisteamina sobre a atividade de enzimas tiólicas e de parâmetros de estresse oxidativo no rim dos animais;

2 - Investigar a atividade de enzimas lisossomais em rim de ratos submetidos à sobrecarga de dimetil cistina éster e/ou cisteamina;

3 - Determinar a atividade da creatinaquinase, da piruvatoquinase, e enzimas lisossomais e parâmetros de estresse oxidativo em leucócitos de pacientes afetados por cistinose, e verificar se o tratamento convencional com cisteamina destes pacientes altera ou não a atividade das enzimas.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS

Aksenov, M., Aksenova, M., Butterfield, A.D., Markesbery, W.R. (2000). Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer's disease brain. *J. Neurochem.* **74**: 2520-2527.

Carvalho, A.Z., Bianco, A.A.G., Beton D., Tejada, E.C.S., da Silva, F.H.L, Ribichich, K.F., Rodrigues, L.O., Miyamoto, S., Koide, T., Bayardo B. Torres (org) *Nutrição e Esporte-Uma abordagem bioquímica*. Instituto de química – departamento de bioquímica. USP (retirado da Internet), último acesso dia 14/02/2007 em <http://sbbq.iq.usp.br/revista/mtdidaticos/esportes.pdf>

Ben-Nun, A., Bashan, N., Potashnik, R., Cohen-Luria, R., Moran, A. (1993) Cystine loading induces Fanconi's syndrome in rats: in vivo and vesicle studies. *Am J Physiol* **265**: 839-844.

Benson, P. F. and Fenson, R. H. Genetic biochemical disorders. Oxford, Oxford univ. Press, 1985, pp. 252-5.

Bergeron, M., Gougoux, A., Noël, J., Parent, L. (2001) The renal Fanconi syndrome, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, (Eds.), *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*, 8th ed., McGraw-Hill, New York **2001**:5023-5038.

Berry EV, Toms NJ Pyruvate and oxaloacetate limit zinc-induced oxidative HT-22 neuronal cell injury. *Neurotoxicology* (in press).

Boya, P., Andreau, K., Poncet, D., Zamzami, N., Perfettini, J.L., Metivier, D., Ojcius, D.M., Jaattela, M., Kroemer, G. (2003) Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. *J Exp Med* **197**: 1323-1334.

Bulfield, G. (1980) Inherited metabolic disease in laboratory animals: A review. *J. Inher. Metab. Dis.* **12**: 166-180.

Burton B.K. (1987) Inborn errors of metabolism: the clinical diagnosis in early infancy. *Pediatrics* **79**: 359.

Cantoni, O., Brandi, G., Albano, A., Cattabeni, F. (1995) Action of cystine in the cytotoxic response of Escherichia coli cells exposed to hydrogen peroxide. *Free Radic Res* **22**: 275-283.

Çcetinkaya, I., Schlatter, E., Hirsch, J.R., Herter, P., Harms, E., Kleta, R. Inhibition of Na⁺-dependent transporters in cystine-loaded human renal cells: electrophysiological studies on the Fanconi syndrome of cystinosis (2002). *J Am Soc Nephrol.* **13**: 2085-2093.

Cherqui, S., Sevin, C., Hamard, G., Kalatzis, V., Sich, M., Pequignot, M.O., Gogat, K., Abitbol, M., Broyer, M., Gubler, M.C. (2002) Antignac C Intralysosomal cystine accumulation in mice lacking cystinosin, the protein defective in cystinosis. *Mol Cell Biol.* **22**: 7622-7632.

Chevalier, R.L. (2006) Pathogenesis of renal injury in obstructive uropathy. *Curr Opin Pediatr.* **18**: 153-60.

Childs, B., Valle, D., Jimenez-Sanchez, G. (2001) The inborn error and biochemical individuality. In Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (eds.). (2001). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th Ed., McGraw- Hill, New York, pp 155-166.

Coelho J.C., Wajner M., Burin M.G., Vargas C.R. and Giugliani R. (1997) Selective screening of 10,000 high risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. *Eur. J. Pediatr.*, **156**: 650 – 654.

Coor, C., Salmon, R.F., Quigley, R., Marver, D., Baum, M. (1991). Role of adenosine-triphosphate (ATP) and Na⁺, K⁺ -ATPase in the inhibition of proximal tubule transport with intracellular cystine loading. *J Clin Invest* **87**: 955-961.

Corcoran, G.B., Fix, L., Jones, D.P., Moslen, M.T., Nicotera, P., Oberhammer, F.A., Buttyan, R. (1994). Apoptosis: molecular control point in toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **128**: 169-178.

Dabrowska, A., Pietkiewicz, J., Dabrowska, K., Czapinska, E., Danielewicz, R. (1998). Interaction of M1 and M2 isozymes pyruvate kinase from human tissues with phospholipids. *Biochim. Biophys Acta.* 123-129.

Das, U.N. (2006). Pyruvate is an endogenous anti-inflammatory and anti-oxidant molecule. *Med Sci Monit.* **12**: 79-84.

David, S.S., Shoemaker, M., and Haley, B.E. (1998). Abnormal properties of creatine kinase in Alzheimer's disease brain: correlation of reduced enzyme activity and active site photolabelling with aberrant cytosol-membrane partitioning. *Mol. Brain Res.* **54**: 276-287.

Del Maestro, R. F. (1980). An approach and to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiologica Scandinavica Supplementum.* **492**: 153-167.

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

Eskelinen, E.L., Tanaka, Y., and Saftig P. (2003). At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *TRENDS in Cell Biology.* **13**: 137-145.

Foreman, J.W., Bowring, M.A., Lee, J., States, B., Segal, S. (1987). Effect of cystine dimethylester on renal solute handling and isolated renal tubule transport in the rat: a new model of the Fanconi syndrome. *Metabolism-clinical and experimental.* **36**: 1185-1191.

Foreman, J.W., Benson, L. (1990) Effect of cystine loading and cystine dimethyl ester on renal brushborder membrane-transport. *Bioscience Reports* **10**: 455-459.

Foreman, Benson, L.L., Wellons, M., Avner, E.D., Sweeney, W., Nissim, L., Nissim, I. (1995). Metabolic studies of rat renal tubule cells loaded with cystine: the cystine dimethyl ester model of cystinosis. *J Am Soc Nephrol.* **6**: 269-272.

Friesen, R.H.E. (1998). Effects of conserved residues on the allosteric regulation of pyruvate kinase: a structure-function study of rabbit muscle and kidney-pyruvate kinase. PhD thesis. Department of Human Biological Chemistry and Genetics, University of Texas Medical Branch at Galveston, TX.

Furfaro, A.L., Menini, S., Patriarca, S., Pesce, C., Odetti, P., Cottalasso, D., Marinari, U.M. Pronzato MA, Traverso N (2005) HNE-dependent molecular damage in diabetic nephropathy and its possible prevention by N-acetyl-cysteine and oxerutin. *Biofactors*. **24**: 291-298.

Furter, R., Furter-Graves, E.M., Wallimann, T. (1993). Creatine kinase: The reactive cysteine is required for synergism but is non-essential for catalysis. *Biochemistry*. **32**: 7022-7029.

Gahl, W.A., Thoene, J.G., Schneider, J.A. (2001). Cystinosis: a disorder of lysosomal membrane transport, in: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. (eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th Ed., McGraw- Hill, New York, pp 5085-5108.

Gahl, W.A., Thoene, J.G., Schneider, J.A. (2002). Cystinosis. *N Engl J Med*. **347**:111-121.

Gahl, W.A., Charnas, L., Markello, T.C., Bernardini, I., Ishak, K.G., Dalakas, M.C. (1992) Parenchymal organ cystine depletion with long-term cysteamine therapy. *Biochem Med Metab Biol*. **48**: 275-285.

- Gellerich, F.N., Schlame, M., Bohnensack, R., Kunz, W. (1987). Dynamic compartmentation of adenine nucleotides in the mitochondrial intermembrane space of rat-heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. **890**: 117-126.
- Gilbert, H.F. (1984). Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange. *Meth Enzymol* **107**: 330–351.
- Giugliani R. (1988) Erros inatos do metabolismo: uma visão panorâmica. *Pediatria Moderna*. **23**: 29 – 40.
- Gross, W.L., Bak, M.I., Ingwall, J.S., Arstall, M.A., Smith, T.W., Balligand, J.L., Kelly, R. (1996). Nitric oxide inhibits creatine kinase and regulates heart contractile reserve. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 5604–5609.
- Hall, E.R. (1978). Cottam GL Isoenzymes of pyruvate kinase in vertebrates: their physical, chemical, kinetic and immunological properties. *Int J Biochem*. **9**: 785 – 793.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. C. (1999). In: Free radicals in biology and medicine, 3^a ed., New York, Oxford university Press.
- Harkins, R.N., Black, J.A., and Rittenberg, M.B. (1977). Purification and characterization of human muscle pyruvate kinase. *Can. J. Biochem*. **55**: 301-307.
- Harman, D. (1956). Ageing: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. **11**: 298–300.

Harman, D. (1981). The ageing process. *Proc Natl Acad Sci USA*. **78**: 7124– 7128.

Hatano, E., Tanaka, A., Kanazawa, A., Tsuyuki, S., Tsunekawa, S., Iwata, S., Ellerby, L.M., Bredesen, D., Freeze, H., Abrahamson, M., Bromme, D., Krajewski, S., Reed, J.C., Yin, X.M., Turk, V. (2004). Inhibition of tumor necrosis factor-induced apoptosis in transgenic mouse liver expressing creatine kinase. *Liver Int*. **24**: 384-393.

Herschkowitz N. (1982) Inborn errors of metabolism affecting brain development. Introduction. In: Cokbum F. & Gitzelmann R., eds. Inborn errors of metabolism in humans. Lancaster, MTP Press Limited, p. 157 – 160.

Hirota, Y., Masuyama, N., Kuronita, T., Fujita, H., Himeno, M., and Tanaka, Y. (2004). Analysis of post-lysosomal compartments. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **314**: 306–312.

Holtzman, N. A (1978). Rare diseases, common problems: recognition and management. *Pediatrics*.**62**: 1056-60.

Ichikawa, I., Kiyama, S., Yoshioka, T. (1993). Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. *Kidney Int*. **45**: 1–9.

Imamura, K., Noguchi, T. and Tanaka, T. (1986).in Markers of Human Neuroectodermal Tumors (Staal, G. E. J. and van Veelen, C. W. M., eds.), pp. 191±222, CRC Press, Boca Raton, FL.

Jiang, S., Moriarty-Craige, S.E., Orr, M., Cai, J., Sternberg, P., Jones, D.P. (2005). Oxidant-induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells: dependence on extracellular redox state. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **46**: 1054-1061.

Jones, D.P. (2006). Extracellular redox state: refining the definition of oxidative stress in aging. *Rejuvenation Res.* **9**: 169-81.

Jones, D.P. (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* **8**: 1865-1879.

Jones, D.P., Go, Y.M., Anderson, C.L., Ziegler, T.R., Kinkade, Jr. J.M., Kirilin, W.G. (2004). Cysteine/cystine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologic redox signaling and control. *FASEB J* **18**: 1246-1248.

Kaneko, M., Masuda, H., Suzuki, H., Matsumoto, Y., Kobayashi, A., Yamazaki, N. (1993). Modification of contractile proteins by oxygen free radicals in rat heart. *Mol.Cel. Biochem.* **125**: 163-169.

Laube, G.F., Shah, V., Stewart, V.C., Hargreaves, I.P., Haq, M.R., Heales, S.J., van't Hoff, W.G. (2006). Glutathione depletion and increased apoptosis rate in human cystinotic proximal tubular cells. *Pediatr Nephrol* **21**: 503-509.

Levtchenko, E., Graaf-Hess, A., Wilmer, A.M., van der Heuvel, L., Monnens, L., Blom, H. (2005). Altered status of glutathione and its metabolites in cystinotic cells. *Nephrol Dial Transplant.* **20**: 1828-1832.

- Lloyd J.B. (1986). Disulphide reduction in lysosomes. *Biochem J* **237**: 271 – 272.
- Locatelli, F., Canaud, B., Eckardt, K.U., Stenvinkel, P., Wanner, C. and Zoccali, C. (2003). Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant*. **18**: 1272–1280.
- Lo D. (1996) Animal models of disease and Basic Science, *Horm. Metab., Res.* **28**: 296 – 298.
- Lubs H.A. (1977) Frequency of genetic disease. In: Lubs H.A. and De La Cruz F.: eds. Genetic counseling. New York Raven Press.
- Mahoney, C.P., Striker, G.E. (2000). Early development of the renal lesions in infantile cystinosis. *Pediatr Nephrol*. **15**: 50-56.
- Mannucci, L., Pastore, A., Rizzo, C., Piemonte, F., Rizzoni, G., Emma, F. (2006). Impaired activity of the gamma-glutamyl cycle in nephropathic cystinosis fibroblasts. *Pediatr Res* **59**: 332-335.
- Mattevi, A., Bolognesi, M. and Valentini G. (1996). The allosteric regulation of pyruvate kinase. *FEBS Letters*. **389**: 15-19.
- Mattson, M. P. Calcium as sculptor and destroyer of neural circuitry. (1992) *Exp. Gerontol*. **27**: 29-49.

Maunsbach, A.B. (1976). Cellular mechanisms of tubular protein transport. *Int. Rev. Physiol.* **11**: 145-167.

McLeish, M.J. and Kenyon, G.L. (2005). Relating Structure to Mechanism in Creatine Kinase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* **40**: 1-20.

Mckusick V.A. (1986) Mendelian inheritance in man. 7^o Ed., London, The Johns Hopkins Press Ltda.

Meneghini, R. (1987). *Ciência Hoje.* (5). **28**: 57-62.

Meyer, R.A., Sweeney, H.L., Kushmerick, M.J. (1984). A simple analysis of the phosphocreatine shuttle. *Am J Physiol.* **246**: C365-C377.

Park MA, Helip-Wooley, A., Thoene, J. (2002). Lysosomal cystine storage increases apoptosis in cultured human fibroblasts and renal proximal tubule epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* **13**: 2878–2887.

Park, M.A., Pejovic, V., Kerisit, K.G., Junius, S., Thoene, J.G. (2006). Increased apoptosis in cystinotic fibroblasts and renal proximal tubule epithelial cells results from cysteinylolation of protein kinase C (delta). *J Am Soc Nephrol.* **17**: 3167-3175.

Perryman, M.B., Kerner, S. ^a, Bohlmeier, T.J., and Roberts, R. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **140**: 981-989.

Pisoni, R.L., Acker, T.L., Lisowski, K.M., Lemons, R.M., Thoene, J.G. (1990). A cystine-specific lysosomal transport system provides a major route for the delivery of thiol to human fibroblast lysosomes: Possible role in supporting lysosomal proteolysis. *J. Cell Biol.* **110**: 327-335.

Rojo, M., Hovius, R., Demel, R.A., Nicolay, K., Wallimann, T. (1991). Mitochondrial creatine kinase mediates contact formation between mitochondrial membranes. *J. Biol Chem.* **266**: 20290-20295.

Saks, V.A., Belikova, Y.O., Kuznetsov, A.V., Kuchua, Z.A., Branishte, T.H., Semenovskiy, M.L., Naumov, V.G. (1991). Phosphocreatine pathway for energy transport. ADP diffusion and cardiomyopathy. *Am J Physiol Suppl* **261**: 30-38.

Saks, V.A., Ventura-Clapier, R., Huchua, Z.A., Preobrazhensky, A.N., Emelin, I.V. (1984). Creatine kinase in regulation of heart function and metabolism. Further evidence for compartmentation of adenine nucleotides in cardiac myofibrillar and sarcolemmal coupled ATPase-creatine kinase systems. *Biochim Biophys Acta* **803**: 254-264.

Salmon, R.F., Baum, M. (1990). Intracellular cystine loading inhibits transport in the rabbit proximal convoluted tubule. *J Clin Invest.* **85**: 340-344.

Savabi, F. (1988). Free creatine available to the creatine phosphate energy shuttle in isolated rat atria. *Proc Natl Acad Sci. USA* **85**: 7476-7480.

Schneider, J.A., Clark, K.F., Greene, A.A., Reisch, J.S., Markello, T.C., Gahl, W.A., Thoene, J.G., Noonan, P.K., Berry, K.A. (1995). Recent advances in the treatment of cystinosis. *J Inher Metab Dis* .**18**: 387-397.

Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (eds.). (1995). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7th Ed., McGraw- Hill, New York.

Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (eds.). (2001). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th Ed., McGraw- Hill, New York.

Sestili, P., Martinelli, C., Bravi, G., Piccoli, G., Curci, R., Battistelli, M., Falcieri, E., Agostini, D., Gioacchini, A.M., Stocchi, V. (2006). Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med*. **40**: 837-849.

Silva, C.G., Bueno, A.R., Schuck, P.F., Leipnitz, G., Ribeiro, C.A., Wannmacher C.D., Wyse, A.S., Wajner, M. (2003). D-2-Hydroxyglutaric acid inhibits creatine kinase activity from cardiac and skeletal muscle of young rats. *Eur. J. Clin. Invest.* **33**: 840-847.

Sinclair L (1982) A new look at the inborn errors of metabolism. *Ann. Clin. Biochem.* **19**: 314 – 321.

Soboll, S., Brdiczka, D., Jahnke, D., Schulze, K., Schmidt, A., Schlattner, U., Wendt, S., Wallimann, T. (1999). Octamer-dimer transitions of mitochondrial creatine kinase in heart disease. *Journal of Molecular Cell Cardiology*. **31**: 857-866.

Southorn, P. A. & Powis, G. (1988). Free radicals in medicine I. Nature and biologic reactins. *Mayo Clinnic Proceedings*. **63**: 381-389.

Staal, G.E.I., Rijksen, in Beitner R. (Ed.) (1985). *Regulation of Carbohydrate Metabolism*. **1**: 143-156.

Stachowiak, O., Dolder, M., Wallimann, T., Richter, C. (1998). Mitochondrial creatine kinase is a prime target of peroxynitrite-induced modification and inactivation. *J. Biol. Chem*. **273**: 16694–16699.

Susztak, K., Raff, A.C., Schiffer, M., Bottinger, E.P. (2006). Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes*. **55**: 225-233.

Suzuki, Y.J., Edmondson, J.D., Ford, G.D. (1992). Inactivation of rabbit muscle creatine kinase by hydrogen peroxide. *Free Radic Res Commun*. **16**: 131-136.

Tomimoto, H., Yamamoto, K., Homburger, H.A., Yanagihara, T. (1993). Immunoelectron microscopic investigation of creatine kinase BB-isoenzyme after cerebral ischemia in gerbils. *Acta Neuropathol*. **86**: 447-455.

Touati, D. (1992). Regulation and protective role of the microbial superoxide dismutases. In: Acandalios JG (ed) *Current communications in cell and molecular biology*. V.

Molecular biology and free radical scavenging systems, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp231–261).

Tyler, D. D. (1975). Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. *Journal of biochemistry*. **147**: 493-504.

van Deurs, B. and Christensen, E.I. (1984). Endocytosis in kidney proximal tubule cells and cultured fibroblasts: a review of the structural aspects of membrane recycling between the plasma membrane and endocytic vacuoles. *Eur. J. Cell Biol.* **33**: 163-173.

Villarreal-Levy, G., Ma, T.S., Kerner, S.A., Roberts, R., and Perryman, M.B. (1987). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**: 1116-1127.

Wajner M., Wannmacher C.M.D., Gaidzinski D., Dutra-Filho C.S., Buchalter M.S. and Giugliani R. (1986). Detection of inborn errors of metabolism in patients of pediatric intensive care units of Porto Alegre, Brazil: comparison of the prevalence of such disturbances in a selected and an unselected sample. *Rev. Brasil. Genet.*, IX, **2**: 331 – 340.

Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K., Eppenberger, H.M. (1992). Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the ‘phosphocreatine circuit’ for cellular energy homeostasis. *Biochem J.* **281**: 21– 40.

Wallimann, T. (1994). Dissecting the role of creatine kinase. *Current Biology*. vol 1 number 4.

Watts, D.C. (1973). in *The Enzymes* (Boyer, P. D., ed) pp.383-455, Academic Press, New York.

Wannmacher C.M.D., Wajner M., Giugliani R., Giugliani E.R.J., Costa M.G., Giugliani M.C.K. (1982) Detection of metabolic disorders among high risk patients. *Brazil. J. Genet.*, **6**: 187 – 194.

Wendt, S., Stachowiack, O., Dolder, M., Schlattner, U., Walliman, T. (1998). Effects of peroxynitrite on creatine kinase: implications for a Ca^{2+} -handling and apoptosis. Abstract S-7, pp63. 5th International Symposium on Guanidino Compounds in Biology and Medicine, Yokohama, Japan, Sept 2-3.

Whittingham, T.S., Lipton, P. (1981). Cerebral synaptic transmission during anoxia is protected by creatine. *J. Neurochem.* **37**: 1618-1621.

Wilmer, M.J., de Graaf-Hess, A., Blom, H.J., Dijkman, H.B., Monnens, L.A., van den Heuvel, L.P., Levtchenko, E.M. (2005). Elevated oxidized glutathione in cystinotic proximal tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **337**: 610-614.

Wyss, M., Smeitink, J., Wevers, R., Wallimann, T. (1992). Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochim Biophys Acta.* **1102**: 119-166.

Xie, J., Guo, Q. (2006). Apoptosis antagonizing transcription factor protects renal tubule cells against oxidative damage and apoptosis induced by ischemia-reperfusion. *Jam Soc Nephrol.* 17: 3336-46.

Xie, J., Shaikh, Z.A. (2006). Cadmium-induced apoptosis in rat kidney epithelial cells involves decrease in nuclear factor-kappa B activity. *Toxicol Sci.* **91**: 299-308.

Zeleznikar, R.J., Goldberg, N.D. (1991). Kinetics and compartmentation of energy metabolism in intact skeletal muscle determined from O-labeling of metabolic phosphoryls. *J Biol Chem.* **266**: 15110-15119.