

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

**EFEITO *IN VITRO* DA CISTINA E DA CISTEAMINA
SOBRE A ATIVIDADE DA CREATINAQUINASE DE
RETINA DE PORCOS**

Por

Paulo Ricardo Pereira de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Clóvis Milton Duval Wannmacher

Dissertação apresentada ao Curso de pós-graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica

Porto Alegre

2004

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Clóvis Milton Duval Wannmacher, pela amizade, paciência e confiança depositada em mim. Pelo exemplo pessoal e estímulo para que esse projeto se tornasse realidade, pelo apoio e pelo modelo médico para toda a minha futura vida docente;
- Ao Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira, pela amizade e pelo estímulo para que a idéia inicial de pós-graduação ganhasse forma;
- Ao Prof. Dr. Carlos Severo Dutra, pela sua disponibilidade e atenção junto às minhas atividades de mestrando;
- À Profa. Dra. Ângela Wyse pela atenção e carinho com que ministra suas aulas e pelos “bons fluidos”, e por lembrarmo-nos sempre que estes são indispensáveis;
- Ao Prof. Dr. Moacir Wajner pelo exemplo de rigor e critério científico e acadêmico;
- Ao Prof. Dr. Jacobo Mellamed, pelo exemplo de médico oftalmologista que é e foi durante toda a minha residência em oftalmologia, embora já há muito tempo, mas sempre inesquecível;
- Ao Prof. Dr. Flávio dos Santos Ferreira, meu professor e oftalmologista, *in memoriam*;
- A Virgínia Ciello Rech, colega prestativíssima, pela amizade, carinho, estímulo e paciência em começar e recomeçar a explicar-me coisas que minha cabeça não conseguia reter;
- Ao Valnês Rodrigues Jr. pela amizade, cooperação, trabalho e ajuda indispensável, sem os quais esse trabalho seria impossível;
- À Tatiana Galetto Rosa, a Rochelle Fleck e a todos os colegas, amigos e colaboradores do laboratório 34;
- À meus amigos Rosy, Anette, Max e Má Kaplan, Conceição, Daniela, Dionara, Edy Marlene, Bayard, Rita, Luiz Eduardo, Dona Deoclenir, "Seo" Geraldo, Ceci, Marcel e Isabella;
- Ao Geraldo, amigo mais que especial, pelo carinho, disponibilidade, dedicação, estímulo, atenção e exemplo e por ser o principal incentivador para que eu retomasse meus projetos acadêmicos;
- À minha filha Livia;
- A meus pais, embora ausentes, pois sem eles eu não estaria aqui;
- E a todas as pessoas que neste período, de uma forma ou de outra, enriqueceram minha vida e me estimularam a mudar para melhor, muito obrigado.

A Buddha.

Setembro de 2004.

UFRGS
Inst. de Ciências Básicas da Saúde
Biblioteca

"Se toda a coincidência.
Tende a que se entenda;
E toda lenda quer chegar aqui.

A ciência não se aprende;
A ciência apreende a ciência em si.

Se toda estrela cadente cai,
prá fazer sentido;
E todo mito
Quer ter carne aqui;
A ciência não se ensina;
A ciência ínsimina
A ciência em si.

Se o que se pode ver, ouvir, pegar, medir, pesar,
Do avião a jato ao jabuti,
Desperta o que ainda não, não se pôde pensar
Do sono eterno ao eterno devir,
Como a órbita da terra abraça o vácuo devagar,
Para alcançar o que já estava ali;
Se a crença quer
Se materializar
Tanto quanto a experiência quer
Se abstrair;

A ciência não avança:
A ciência alcança
A ciência
Em si."

"A ciência em si" - Gilberto Gil - Quanta, 1997.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
1.INTRODUÇÃO GERAL	01
1.1. A Cistinose.....	01
1.2. - A Retina.....	10
1.3. O Processo de Foto-tradução.....	14
1.4. Creatinaquinase e o Metabolismo Retiniano.....	17
1.5. Objetivo Geral.....	23
1.6. Objetivos específicos.....	23
2. MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
ARTIGO: Paulo Ricardo Pereira de Oliveira, Valnês Rodrigues Júnior, Virgínia Cielo Rech, Ângela Terezinha de Souza Wyse, Carlos Severo Dutra-Filho, Moacir Wajner, Clóvis Milton Duval Wannmacher. <i>Cysteamine prevents the in vitro inhibition of creatine kinase activity caused by cystine in pig retina.</i> (enviado para publicação no periódico Experimental Eye Research).....	24
3. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	46
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS.....	51

RESUMO:

A cistinose clássica é um erro inato do metabolismo caracterizado pelo acúmulo de L-cistina sob forma de cristais livres nos lisossomos dos tecidos dos pacientes afetados. Os pacientes com este distúrbio poderão apresentar prejuízo progressivo da função renal, necessitando de diálise ou transplante renal antes dos 12 anos de idade por falência funcional. A essas alterações, somam-se o retardo no crescimento, raquitismo, diabetes melito e um acometimento ocular principalmente nas córneas e retinas, com depósitos de cristais estromais e uma degeneração retiniana relacionada ao acúmulo direto ou indireto de cistina, além de modificações metabólicas na síntese de ATP. Tradicionalmente, a cistinose poderá se apresentar sob três formas: uma infantil ou forma clássica, de evolução mais rápida e com comprometimento mais intenso da função renal (síndrome de Fanconi), óssea e ocular, uma forma intermediária ou juvenil, e uma forma mais tardia de manifestação ou variante adulta. O núcleo desse erro metabólico pode ser entendido como causado por mutações no gene CTNS, codificador da síntese da proteína cistinosina, principal transportadora trans-lisossômica da cistina para fora da organela. A cistina presente nos tecidos é decorrente da oxidação direta de duas moléculas de cisteína. A cisteína por sua vez é precursora de síntese protéica e produto de hidrólise de proteínas simultaneamente e, obtida a partir de um aminoácido essencial, a metionina. O acúmulo progressivo de cistina em tecidos tais como os rins, o coração e a retina, tem suscitado questões comuns sobre como o funcionamento da creatinaquinase (CK) e a bomba de fosfocreatina operam e como a disponibilidade de ATP sob estas circunstâncias se mantém. Clinicamente, considera-se que o tratamento para a cistinose inclui administração oral ou tópica de cisteamina. O principal objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a atividade da creatinaquinase na retina de porcos adultos na presença de diferentes concentrações de cistina e em diferentes tempos de pré-incubação, na presença ou não de cisteamina. Nossos resultados demonstraram que a presença da cistina mostrou uma inibição significativa da atividade da CK nas retinas dos animais, dependente do tempo de pré-incubação e da concentração de cistina. A cisteamina foi capaz de prevenir e reverter o efeito inibitório desencadeados pela cistina sobre a enzima. Se estes efeitos ocorrerem na retina dos pacientes cistinóticos, é possível que a inibição da atividade da CK constitua-se num dos mecanismos de toxicidade da cistina, e que um dos mecanismos de ação da cisteamina seja a prevenção e reversão desta inibição.

ABSTRACT:

Classic cystinosis is an inherited metabolic disorder characterized by the accumulation of L-cystine under the form of free crystals in lysosomes of affected patients. Individuals with this disorder may present progressive impairment of kidney activity, leading to dialysis or transplantation before the age of twelve years by total collapse of renal function. Further manifestations of this disorder may include failure to thrive, rickets, diabetes mellitus and many ocular signs typically found on corneas and retinas, such as stromal deposits of crystals and a retinal degeneration directly related to the accumulation of cystine as well as alterations on ATP metabolic synthesis in retina itself. Traditionally, cystinosis may be presented under three different clinical forms: an infantile or classic form, with faster evolution and more severe impairment of renal function (Fanconi's syndrome), bones and eyes, an intermediate or juvenile form and a third form of cystinosis with late onset, considered the adult variant. The focus of this disorder may be understood as linked to a variety of mutations on CTNS gene, the encoder of cystinosin synthesis, which is the main cystine transporter throughout lysosomal membrane. Cellular cystine is consequence of direct oxidation of two cysteine molecules. Cysteine, by its turn, is the forerunner of protein synthesis and simultaneously final product of protein hydrolysis. It is obtained from methionine, an essential amino acid. Progressive accumulation of cystine in organs such as kidneys, heart, and the retina has led to further questions on what basis creatine kinas and phosphocreatine shuttle effectively operates and on how the availability of ATP under these circumstances, is held. Clinically, it is considered that the treatment to cystinosis ranges the oral or topical administration of cysteamine. The main purpose of this work was to evaluate the *in vitro* creatine kinase activity in retina of adult pigs with the presence of cystine under different concentrations and pre-incubation times with or without the addition of cysteamine. Our results demonstrated that the presence of cystine caused a significant inhibition of creatine kinase activity in retinas of these animals, depending on the pre-incubation time and cystine concentration. Thus, cysteamine was able to prevent and revert the inhibitory effects mediated by cystine over the enzyme. If these effects would occur on retina of cystinotic patients, it is likely that the inhibition of creatine kinas activity consists in one of the mechanisms of cystine toxicity and also one of the mechanisms of action of cysteamine might be prevention and reversion of this inhibition.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A cistinose

A cistinose clássica é um erro inato do metabolismo decorrente do acúmulo anormal do aminoácido dissulfurado cistina sob a forma de cristais livres no interior dos lisossomos celulares (Richler et al. 1991; Shotelersuk et al.1998; Anikster et al.2000; Gahl et al.2001). Em tecidos de pacientes cistinóticos, a presença de cistina livre resulta em seu acúmulo nos tecidos, sob a forma de cristais, em concentrações que podem atingir até 50 a 100 vezes a fisiológica, resultando em dano tecidual (Richler et al.1991). Os pacientes, embora normais ao nascimento, podem desenvolver comprometimento renal com o prejuízo de função por volta dos 6 a 18 meses de idade, acompanhado de retardo no crescimento, raquitismo hipofosfatêmico, dificuldades de deglutição, poliúria, polidipsia e hipocalcemia (Anikster et al.2000).

Usualmente, as lesões renais progressivas acarretam falência de sua função por volta dos 9 a 10 anos de idade, requerendo diálise ou transplante renal (Kaiser Kupfer et al.1986; Kaiser-Kupfer et al.1990). Hipotireoidismo, comprometimento visual, insuficiência pancreática exócrina e endócrina, disfunção testicular, miopatia distal vacuolar e alterações neurológicas podem ainda advir àqueles pacientes que sobreviverem até a segunda ou terceira década de vida em consequência de um transplante renal. Neste último caso, é interessante frisar que a cistina pode seguir se acumulando nos demais tecidos restantes do paciente mas usualmente não no rim transplantado (Kaiser-Kupfer et al.1986; Anikster et al. 2000), embora haja relatos em contrário (Scotto and Stralin, 1977; Spear et al, 1989). François (1982) acrescenta a esses achados, outros sinais clínicos de hepato e esplenomegalia por acúmulo de cistina no fígado, baço, linfonodos, medula óssea e olhos.

Para Richler et al. (1991), a cistinose poderá então, se apresentar sob três formas clínicas, a saber, a forma infantil, a forma adolescente ou juvenil e uma forma mais tardia, ou forma adulta.

A forma infantil inicia no primeiro ano de vida (François, 1982) e é caracterizada pelas alterações decorrentes de colapso tubular renal com retardo do crescimento, raquitismo e falência renal progressiva, freqüentemente levando à morte ou necessidade de diálise e transplante por volta dos 10 a 13 anos de idade, conforme já enfatizado. Ainda estão descritos achados oculares que abrangem a presença de cristais corneanos e conjuntivais e que pioram com a idade (Gahl et al.2000; Tsilou et al.2002b), depósitos na íris, bem como alguma forma de retinopatia periférica (Kaiser-Kupfer et al.1986) . Wan et al. (1986) descrevem um caso de glaucoma secundário por bloqueio pupilar numa criança com alterações iridianas decorrentes da cistinose, por fechamento de ângulo do trabeculado. Richler et al.(1991) ainda sugerem que a descrição de todo o espectro de manifestações da cistinose torna-se uma tarefa difícil devido à raridade de ocorrência da doença e a poucos casos relatados e, em adição, Anikster et al.(2000) sugerem que variações na forma clássica da cistinose contribuem para ampliar a gama de manifestações da doença. Atualmente, o diagnóstico clínico de cistinose é realizado levando-se em conta o quadro sintomatológico e a análise do nível de cistina presente nos leucócitos, o qual deverá ser maior que 0,2 nmol de meia-cistina por mg de proteína. Em indivíduos hígidos a contagem é inferior a 0,2 nmol meia-cistina/mg proteína (Tsilou et al.2002b).

Indivíduos com a forma intermediária ou juvenil da doença apresentam os mesmos sintomas daqueles manifestados na forma clássica, mas têm início mais tardio (Gahl et al., 2001). A forma adulta restante, também chamada "benigna" ou não-nefropática ocular, caracteriza aqueles pacientes que não sofrem de doença renal e não mostram anormalidades no pigmento retiniano. Essa forma, entretanto, traduz anormalidades na córnea por depósitos de cristais, além de alterações na medula óssea.

A presença de cristais na córnea pode ser identificada ao exame de biomicroscopia com a lâmpada de fenda, já por volta do primeiro ano de idade, e tende a obedecer a um padrão

homogêneo, central, que inexoravelmente cresce até em torno dos 2 anos de vida (Kaiser-Kupfer et al.1991). Considera-se que esses achados oftalmológicos sejam tão característicos que podem servir de critério clínico diagnóstico para a cistinose (Kaiser-Kupfer et al.1991). No decorrer da evolução da patologia, esses cristais tendem a ocupar o terço inferior periférico da córnea ou os dois terços anteriores da córnea central (Kaiser-Kupfer et al.1991). Atribui-se a fotofobia sentida por pacientes jovens ou idosos, com graus variáveis de desconforto, à presença dos cristais na córnea, embora estes cristais possam não colaborar diretamente para a queda da acuidade visual verificada em alguns pacientes. Em estudo realizado de 1976 até 2000, Tsilou et al (2002a) acompanharam 172 pacientes com cistinose nefropática e concluíram que, se por um lado o transplante renal possibilitou esses pacientes chegarem até a vida adulta, por outro, a incidência de complicações oculares outras, além das já anteriormente descritas, comprometendo córnea, foram pouco a pouco se acumulando, à medida que o paciente envelhecia. Como complicações corneanas adicionais nestes pacientes com cistinose infantil supracitados, documentou-se a presença de ceratite puntata superficial, ceratite filamentar, neovascularização periférica corneana severa, ceratopatia em faixa e sinéquias posteriores com o espessamento da íris. Kaiser-Kupfer et al.(1986) descrevem em oito pacientes acompanhados a ocorrência da deposição de cristais na face anterior do cristalino e a diminuição da acuidade visual atribuível a uma retinopatia pigmentar. De modo geral, os autores parecem confluír na opinião de que as causas de todas essas alterações permanecem, em grande parte, especulativas (François,1982;Gahl et al.2001).

Típicamente rara, a cistinose possui um caráter autossômico recessivo e resulta de mutações no gene CTNS, primeiramente mapeado no cromossomo 17p13 por análise de vínculo (Cystinosis Collaborative Research Group 1995) (Shotelersuk et al.1998; Gahl et al.2001), mas somente em 1998 foi isolado o gene causador desta patologia (Town et al.1998 apud Shotelersuk et al.1998). Esse gene codifica a síntese da proteína cistinosina, responsável

pelo transporte da cistina através da membrana lisossômica (Gahl et al.2001). Até o presente, 31 novas mutações no gene CTNS foram encontradas, sendo a mais comum, uma deleção de 65 kb detectada principalmente em pacientes com ascendência do norte da Europa (Anikster et al.2000). Richler et al. (1991), em seu estudo, avaliaram a prevalência da cistinose na população do Canadá francês como sendo a mais alta do mundo, talvez devido à pouca heterogeneidade genética associada àquela população. Gahl (2003), em estudo mais recente, informa haver mais de 50 mutações no gene CTNS, sendo que 50 % delas presentes em pacientes procedentes do norte europeu. Na cistinose nefropática clássica, aproximadamente metade dos alelos mutantes do gene referido contém uma deleção 57 kb (Town et al.1998; Forestier et al. 1999 apud. Gahl et al. 2001).

Segundo Shotelersuk et al.(1998), o gene que determina a cistinose possui 12 exons. Seu RNA mensageiro codifica a síntese da proteína cistinosina composta de 367 aminoácidos. O sistema transportador de cistina através da membrana lisossômica é saturável e bidirecional (Gahl et al.1983 apud Shotelersuk et al.1998) e demonstra apresentar um efeito dependente da carga genética nos indivíduos heterozigotos para cistinose (Gahl et al.1984 apud Shotelersuk et al.1998).

Historicamente, os primeiros relatos da cistinose como uma entidade clínica remontam ao ano de 1903, feitos por Abderhalden através de um manuscrito intitulado "Familiare Cystiadiathese". Nele, estavam descritos vários casos de crianças nas quais era encontrado um acúmulo anormal de cistina (Gahl et al.2001). Em sua casuística inicial, havia a descrição de uma criança com um defeito de crescimento percebido aos 21 meses e meio de idade, em cujos órgãos internos estavam presentes lesões puntiformes, mais tarde analisadas quimicamente como sendo resultantes do acúmulo de cistina. Em seus primeiros ensaios, Abderhalden também incluía achados de crianças que apresentavam cálculos renais de cistina ou presença de cistina na urina, o que ocasionou alguma confusão persistente na

diferenciação das patologias cistinose e cistinúria. Mais tarde, em 1924, Lignac verificou a associação de depósitos de cistina em três crianças com comprometimento do crescimento, raquitismo, nanismo e doença renal, e reconheceu finalmente o aspecto hereditário da desordem (Wong et al.1967). Em 1931, Fanconi descreveu casos de glicosúria não associada à diabete e estabeleceu diferenças entre essa enfermidade, formas de raquitismo renal clássico, e osteodistrofia renal azotêmica (Wong et al.1967). A descrição de um caso semelhante em crianças descrito por Debré ocorreu em 1934 (Gahl et al.2001). De Toni, em 1935, relatou um caso de raquitismo refratário ao tratamento com vitamina D em uma criança com nanismo acompanhado de hipofosfatemia, acidose, albuminúria e glicosúria. Mais tarde esta condição passaria a ser denominada síndrome de Toni-Debré-Fanconi. Entretanto, os primeiros relatos da presença de depósitos de cristais de cistina em córnea e conjuntiva num paciente jovem foram relatados por Bürki somente em 1947 (Wong et al.1967). Subseqüentemente, todos os demais casos reportados da síndrome acusavam a presença de opacidades refratárias em córnea e conjuntiva, todas demonstráveis ao exame de inspeção pela lâmpada-de-fenda. Biópsias conjuntivais posteriores demonstrariam tratar-se de cristais de L-cistina (Bürki,1941; Cogan et al.1956 apud Wong et al.1967).

Wong et al. (1967) ainda afirmam terem descoberto uma alteração, previamente não relatada, na retina periférica, através de um estudo feito pela observação fundoscópica de onze crianças com diagnóstico de cistinose. Essas alterações se caracterizavam por extensas áreas de degeneração e perda do epitélio pigmentar retiniano e que, segundo os autores, não haviam sido anteriormente descritas. No referido estudo, todas as crianças apresentavam alterações corneanas com depósitos de cristais diagnosticados ao biomicroscópio e, igualmente, demonstravam uma retinopatia que envolvia o epitélio pigmentar retiniano. Como achados adicionais, estavam descritos cristais no estroma da córnea, presentes principalmente na periferia, e que tendiam à simetria em ambos os olhos. Em um paciente

examinado, a presença dos cristais era vista ao nível da membrana de Descemet e também no endotélio corneano, bem como na face anterior da íris. Os cristais demonstravam um aspecto policromático e a simetria também foi percebida nas conjuntivas dos pacientes examinados. Em apenas um paciente a presença dos cristais estendia-se à área da íris, caracteristicamente castanha, no caso descrito. Sintomas oculares como fotofobia foram predominantes, embora com acuidade visual sem correção variando de 20/30 em ambos os olhos a 20/20 em um olho somente, mas apenas em um caso isolado. Feitos testes de resposta visual às cores primárias, estes demonstraram serem normais e os testes de confrontação para os campos visuais também pareciam inalterados. O eletroretinograma e os testes de adaptação ao escuro foram normais naqueles pacientes.

A fundoscopia retiniana revelou, entretanto, uma área de despigmentação na retina que se estendia da área equatorial do fundo de olho até a *ora serrata*, que freqüentemente assumia um padrão irregular com áreas de despigmentação mais fina intercalada com outras áreas de aspecto mais grosseiro, nas quais o epitélio pigmentar parecia aglutinado. Esse estudo primariamente descreve achados nos quais o epitélio retiniano assume áreas de aglutinação de pigmento em forma de "anel" interpermeadas por outras áreas de retina central mais clara. Essas áreas de aglutinação de pigmento retiniano variavam em tamanho a aproximadamente um décimo do diâmetro papilar e obedeciam a um padrão muito fino como que "salpicado com pimenta".

Achados semelhantes a um fundo de olho com aspecto de "sal e pimenta" estão presentes nos mesmos trabalhos de Moses e Boichis (1975) apud François (1982) e de Hammerstein (1976) apud François (1982) de padrões difusos e simétricos mais evidentes na periferia retiniana. Por outro lado, o estudo de Wong et al. (1967) parece associar essas alterações fundoscópicas com as perturbações do epitélio pigmentar da retina e frisa que as

alterações parecem simétricas e envolvem mais os lados temporais da retina, respectivamente.

Posteriormente, em um estudo realizado em 1982, François tentou estabelecer uma relação causal para a degeneração retiniana presente na cistinose com o distúrbio metabólico subjacente. Em seu relato ele descreve a alteração retiniana da cistinose como uma degeneração tapetoretiniana, (i.e., com alterações ao eletroretinograma) preponderando mais na retina periférica, regularmente vista na cistinose infantil, nunca na forma adulta, e raramente vista na forma intermediária. Em seus pacientes, também observou um caráter simétrico freqüentemente assumindo uma "faixa" e que se distribuía do equador à periferia do fundo de olho. As anormalidades de aspecto do pigmento retiniano tendiam a se suavizar após o equador do pólo posterior. Em testes realizados, verificou-se que os tamanhos da papila óptica (nervo óptico) e vasos estavam normais, bem como não havia alterações nos campos visuais, nos testes de adaptação ao escuro e nos eletroretinogramas e oculogramas. Histologicamente, documentou uma degeneração do epitélio pigmentar retiniano com grandes lacunas de pigmento acompanhadas por áreas de acúmulos, onde pigmentos aglutinados em grânulos eram observados. Casos de retinopatias mais severas poderiam também ter envolvimento coroidal. Maculopatia com aspecto "mosqueado" e amarelado foi documentada em dois pacientes cistinóticos com algum grau de parentesco (Sanderson et al.1974 apud François, 1982). Nesses dois casos, especificamente, alterações mais severas do fundo de olho foram encontradas, tais como uma grande degeneração do epitélio pigmentar comprovada pelo exame ultraestrutural e histopatológico. Alterações retinianas com aspecto de "sal e pimenta" eram mais pronunciadas entre o equador e a *ora serrata*.

Acrescenta ainda a descrição de um caso de degeneração tapetoretiniana em uma paciente feminina de 5 anos, com diagnóstico de cistinose e com presença de cristais de cistina na córnea. Entre os achados, ele informa que a retina periférica era normal, exceto na área do

equador, onde zonas amareladas despigmentadas podiam ser vistas. O disco óptico e os vasos estavam normais, mas o exame de eletroretinografia não mostrava resposta fisiológica, o que acarretava um diagnóstico de degeneração tapetoretiniana. François faz menção a Read et al.(1973) que igualmente descreveram o caso de uma menina de 5 anos com alterações retinianas fundoscópicas de aspecto "sal e pimenta" associadas à cistinose, com alterações eletroretinográficas, o que conduz a um diagnóstico mais grave, de degeneração retiniana.

Finalmente, François lamenta e considera uma limitação nas pesquisas que envolvem o tecido retiniano humano, a inviabilidade de se remover *in vivo* uma porção de retina para estudo, posto que acarretaria em dano visual irreversível. Para ele, entretanto, a base fisiológica e bioquímica causal dessas perturbações funcionais permanece em aberto.

Atualmente, o manejo terapêutico dos pacientes com cistinose abrange um enfoque amplo de modo a corresponder aos problemas apresentados. Assim, pacientes que apresentarem síndrome de Lignac-Debré-Fanconi, com grande desequilíbrio de água e eletrólitos, podendo desenvolver desidratação por perdas de líquidos, deverão ter suas perdas de água e eletrólitos repostas. A suplementação com vitamina D visa a melhorar a absorção de fosfato gastrointestinal e o uso sistêmico de indometacina tem demonstrado ser de algum benefício no manejo de algumas crianças com cistinose por diminuir as perdas renais (Gahl et al.2000). O alto índice de dano renal com morte por uremia em crianças por cistinose tem levado à indicação de diálise ou transplante renal, usualmente antes da puberdade de modo a evitar o êxito letal. Outras formas de tratamento incluem a restrição dietética de alimentos com cistina ou cisteína ou o uso de drogas como a penicilamina, o ditiotreitól e o ácido ascórbico. Para fins do presente trabalho será testada a droga cisteamina, usada em terapia oral ou tópica.

Segundo Gahl et al (2000b) o uso oral da cisteamina (β -mercaptoetilamina) tem se mostrado eficiente na remoção da cistina das células cistinóticas, protegendo os pacientes do dano tecidual decorrente do acúmulo de cistina. Para complicações decorrentes do retardo no crescimento está indicada a administração de hormônio do crescimento. O uso de cisteamina

oral, entretanto, não tem se mostrado eficaz no sentido de evitar o acúmulo de cristais na córnea conforme alguma literatura referenciada (Kaiser-Kupfer et al.1990; Kupfer et al.1990;Gahl et al.2000; Gahl et al.2001) Tal acúmulo de cristais na córnea se mostra responsável por tais achados clínicos referidos anteriormente, tais como a sensação de corpo estranho corneano, as erosões, e ulcerações descritas (Wong et al.1967; Kaiser-Kupfer et al.1990; Gahl et al.2000; Gahl et al.2001).

Em trabalho de observação com 25 pacientes cistinóticos em tratamento com alterações corneanas, Kaiser-Kupfer et al. (1990) sugerem que o uso tópico de cisteamina em gotas foi capaz de proporcionar uma melhora subjetiva dos sintomas corneanos bem como a remoção de alguns cristais (clareamento) e a prevenção da ruptura corneana. Mais tarde, em estudo realizado por Gahl et al. em 2000, obteve-se resultados coincidentes com as conclusões supradescritas por Kaiser-Kupfer et al (1990).

Cantani et al. (1983) assinalaram, entretanto, que a efetividade do uso sistêmico ou tópico na tentativa de controlar os efeitos renais ou manifestações oculares foram inconclusivos em suas experiências, uma vez que, embora a fotofobia subjetiva de alguns pacientes tenha melhorado, a presença de cristais corneanos ao exame oftalmológico ainda se mostrava presente. Além disso, os efeitos colaterais decorrentes do uso de cisteamina, tais como convulsões (Thoene et al.1976 apud Cantani, Giardini and Cantani, 1983), febre, letargia, *rashes* maculopapulares e leucopenia sugerem o uso cauteloso desta terapia restrito especialmente àqueles pacientes que apresentarem boa função renal e que se beneficiaram de um diagnóstico oftalmológico precoce. A abordagem oftalmológica eficaz para o tratamento clínico ou cirúrgico destinado às alterações retinianas decorrentes da cistinose, mostra ainda uma lacuna a ser preenchida em toda a revisão bibliográfica consultada.

1.2. A Retina

Para que se possa melhor acompanhar as considerações bioquímicas a que esta dissertação se refere, faz-se necessário discorrermos sobre algumas estruturas anatômicas retinianas e relembremos suas funções. Considerações maiores sobre os aspectos anatômicos retinianos ou de sua fisiologia e bioquímica fogem ao escopo deste ensaio, mas podem ser alcançadas reportando-se aos trabalhos de Gordon e Bazan (1997), Dantas e Patrão (1992) ou à internet (<http://webvision.med.utah.edu>).

A retina humana é composta de seis tipos de células nervosas, organizadas em oito camadas distintas (Gordon and Bazan, 1997). Compõem a retina os fotorreceptores, as células horizontais, as células bipolares, as células amácrinas, as células da camada interplexiforme e as células ganglionares. Sua organização celular em camadas é primeiramente composta pelo epitélio pigmentar da retina (EPR) que é uma camada monocelular de células cubóides nas seções transversais e poligonais nas seções horizontais (Dantas and Patrão, 1992), situada entre a coriocapilar e a retina propriamente dita, em íntimo contato com a extremidade distal dos fotorreceptores. Estes, por sua vez, estão associados à membrana de Bruch, uma estrutura extracelular espessa em contacto com a vasculatura da coriocapilar. O epitélio pigmentar retiniano (EPR) isola efetivamente o espaço subretiniano da circulação geral e desse modo, nutrientes deverão cruzar essas células para entrar na retina. Separando a retina neural da coróide altamente vascularizada (Kennedy et al. 2000), o epitélio pigmentar da retina encontra-se em grande intimidade com os cones e bastonetes. Apresenta uma grande riqueza de pigmento, a melanina, que se situa na extremidade distal dos fotorreceptores.

O EPR cumpre a função de regular o movimento de nutrientes e metabólitos pelo espaço entre os fotorreceptores, realizar fagocitose, metabolismo da vitamina A (retinol), transporte de solutos e de água, controle do fluxo de íons entre os fotorreceptores e suprimento sanguíneo (Bok, 1993). Outros tipos celulares, as células de Muller, espalham-se

por toda a espessura da retina entre todas as demais células retinianas. A rede capilar vincula a artéria central da retina com a veia central através do centro do nervo óptico (Gordon and Bazan,1997). A vasculatura da retina apresenta células comuns a todos os outros tipos de vasos, mas em alguns tipos retinianos poderá ocorrer a presença de astrócitos associados a outros elementos vasculares, sobretudo na área próxima à papila (Chan-Ling,1994 apud Gordon and Bazan, 1997).

Os fotorreceptores são neurônios altamente especializados e diferenciados, os quais possuem um amontoado de membranas fotossensíveis na sua parte distal, uma região central rica em organelas, e um terminal de sinapse longo. Tendo como base a sua estrutura, os fotorreceptores são classificados como bastonetes ou cones (Crescitelli, 1972 apud Gordon and Bazan,1997). Os bastonetes podem variar grandemente seu diâmetro, sendo maiores em alguns anfíbios e répteis, com 10-12 μm , atingindo 1-2 μm em alguns mamíferos. Os bastonetes possuem a forma cilíndrica e são constituídos de uma pilha de discos de membranas que estão isolados da membrana plasmática na região basal dos segmentos externos (Gordon and Bazan,1997). Os bastonetes são responsáveis pela percepção da luz de baixa intensidade, pela visão noturna, e pela percepção de claro e escuro, preto e branco (Dantas and Patrão,1992). São mais sensíveis à captação de luz que os cones e estão dispostos por toda a superfície retiniana, com exceção da área da papila do nervo óptico e área da fóvea.

O segmento externo dos cones combina uma forma cilíndrica com uma cônica e, do mesmo modo que os bastonetes, também são compostos de uma camada de discos membranosos encapsulados na região basal de outros segmentos externos. Os cones são os fotorreceptores encarregados da percepção luminosa de cor, forma, detalhe e estão presentes na retina humana em cerca de 6.000.000 em cada olho. Sua densidade na área central da retina ou mácula beira a 1.500.000 por mm^2 (Dantas and Patrão,1992). Conectando um fotorreceptor com outros, estão as células horizontais, as quais são neurônios "estrelados" de

aproximadamente 100 a 400 μm de diâmetro. Há quatro tipos morfológicos de células horizontais encarregadas da transmissão para cada cone, sendo o tipo H1 para os cones vermelhos, H2 para os cones verdes, H3 para os cones azuis e Hr para os bastonetes. Sabe-se que o número de células horizontais é proporcional ao número de fotorreceptores para cada espécie animal (Gordon and Bazan, 1997). Células bipolares conectam a camada plexiforme interna com a camada plexiforme externa levando informação visual dos fotorreceptores para as células amácrinas e células ganglionares assim como para a camada interplexiforme. As células amácrinas possuem um núcleo avantajado e não apresentam axônio, vinculando as células bipolares, ganglionares e camada interplexiforme numa trama lateral, acoplando-as sinapticamente de modo a produzir estímulos específicos para a camada subjacente de células ganglionares. Antes destas, encontra-se a camada de células interplexiforme, que carrega informação visual da camada interplexiforme interna para a camada interplexiforme externa, recebendo insumo das células amácrinas e de fibras centrífugas cerebrais (Gordon and Bazan, 1997). As restantes células são as células ganglionares que são pós sinápticas e que recebem informação das células amácrinas e/ou bipolares. Os axônios das células ganglionares têm seu trajeto sobre a parte interna da superfície da retina saindo no disco óptico para formar o nervo óptico e terminar no núcleo geniculado lateral ou teto óptico. Suas fibras axonais quando entram no nervo óptico tornam-se mielinizadas e, em algumas espécies, como por exemplo os coelhos, essas fibras permanecem mielinizadas mesmo na intimidade da retina (Wässle, 1982 apud Gordon and Bazan, 1997).

Uma última classe de fibras retinianas, denominadas fibras centrífugas, têm sua origem no cérebro, as quais penetram na retina via nervo óptico (Ramón and Cajal, 1972 apud Gordon and Bazan, 1997). As figuras 1 e 2 a seguir, procuram ilustrar as várias estruturas descritas no texto (Kolb et al.2002).

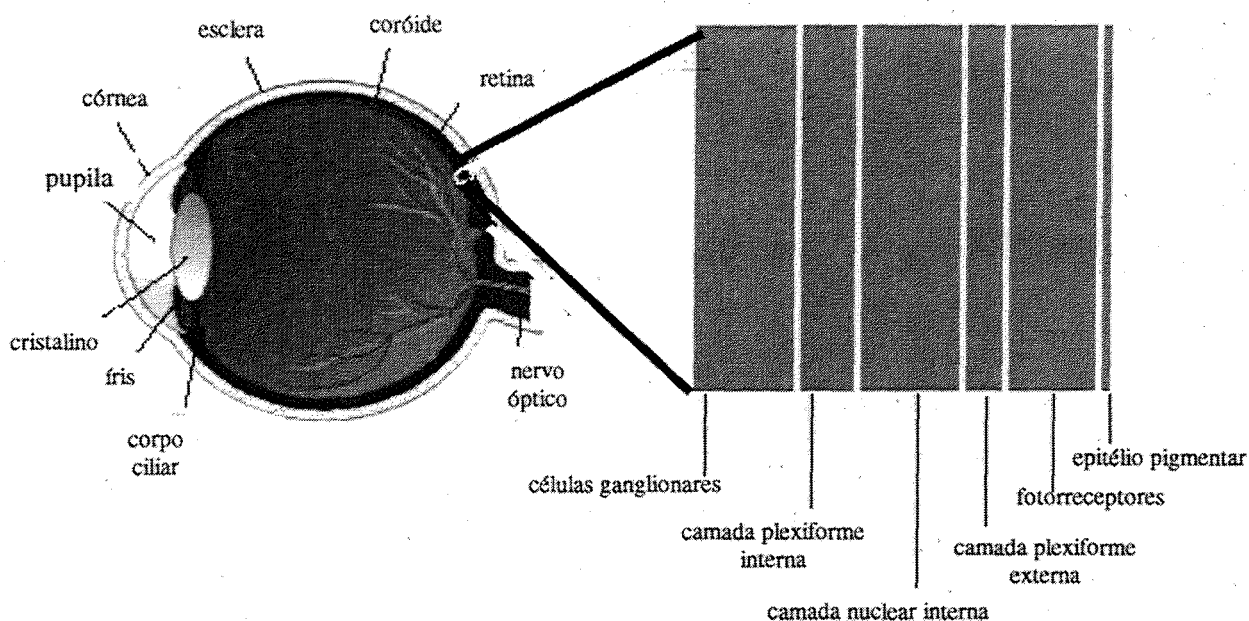


Figura 1: O diagrama do olho humano mostra suas várias estruturas (à esquerda). Uma fina fatia de retina está representada à direita numa fotomicrografia, revelando suas camadas. Os fotorreceptores jazem contra uma fileira escura de células denominadas de epitélio pigmentar. (adaptado e modificado de Kold et al.2002)

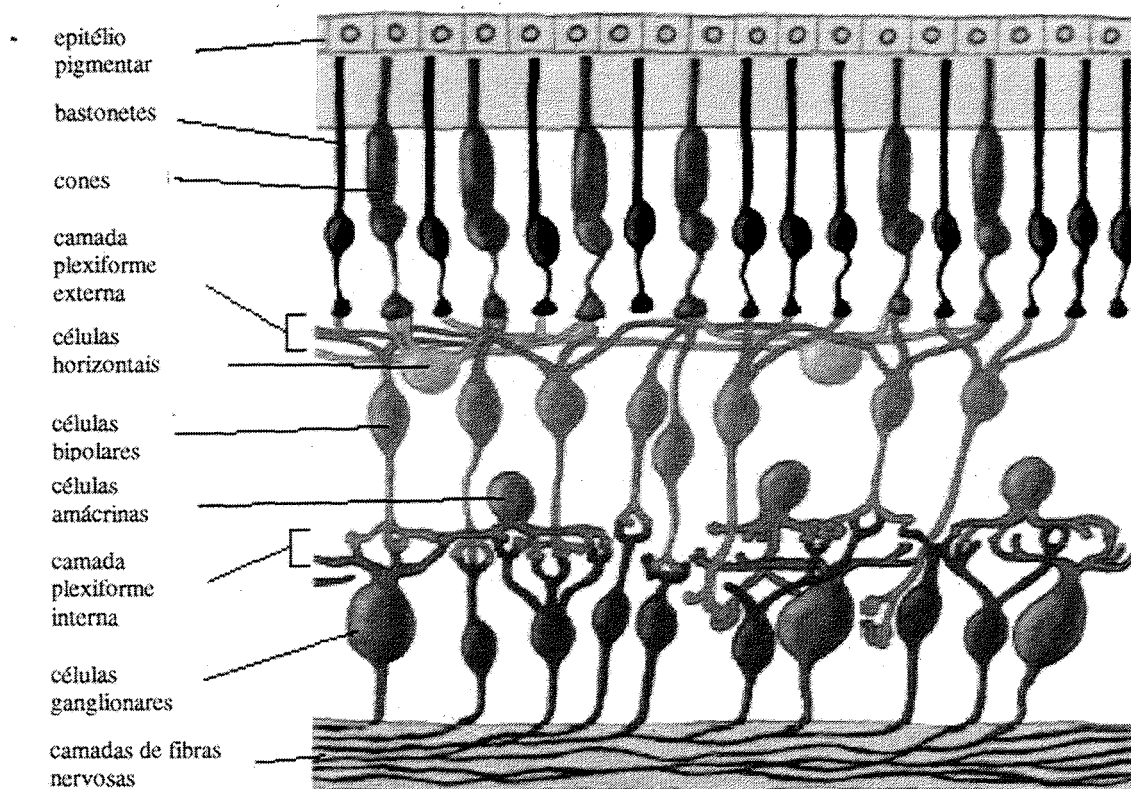


Figura 2: As células na retina arranjam-se em camadas sobrepostas. Os fotorreceptores situam-se ao topo, próximos ao epitélio pigmentar. Os corpos das células horizontais e bipolares compõem a camada nuclear interna. As células amácrinas ficam justapostas às células ganglionares próximas à superfície da retina. Conexões neuronais axônio-dendritos compõem as camadas plexiformes separando fileiras de corpos celulares (adaptado e modificado de Kolb et al.,2002).

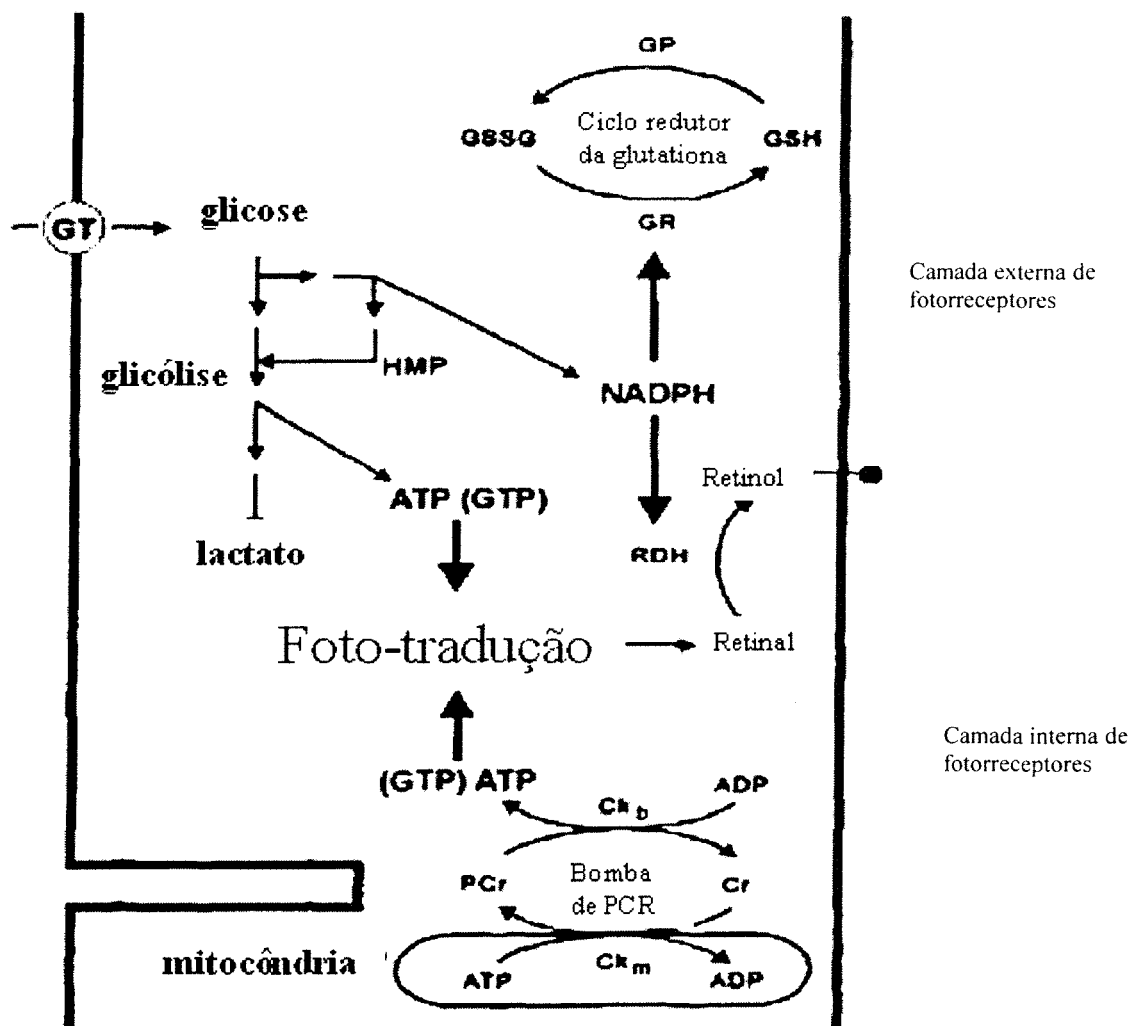
1.3. O processo de fototradução

A tradução visual, ou percepção luminosa, engloba uma seqüência de eventos fotoquímicos, bioquímicos e eletrofisiológicos nos quais a absorção de um fóton, numa molécula de pigmento dentro de um fotorreceptor, desencadeia a modificação dos canais de cálcio e sódio nas membranas plasmáticas, sendo capaz de gerar uma resposta elétrica celular detectável através da conexão sináptica (Chabre and Deterre, 1988; Gordon and Bazan, 1997). Neste ensaio, apenas os aspectos bioquímicos serão salientados, ainda que de forma sintética ou seletiva, uma vez que não se inclui dentro dos objetivos, o estudo aprofundado de todas as rotas metabólicas envolvidas na fototradução ou de suas variantes, mas sim focar as rotas direta ou indiretamente relacionadas à enzima em questão i.e., à creatinaquinase, e facilitar o entendimento da questão principal como será tratada mais detalhadamente, a seguir. De qualquer modo, para uma revisão mais completa do tema, recomendam-se os trabalhos de Chabre e Deterre (1982), Gordon e Bazan (1997) e Stecher et al. (1999).

Embora os cones e bastonetes sejam estruturalmente diferentes e contenham formas discretamente distintas de pigmento visual, o primeiro estágio de ambos os ciclos visuais é similar. Resumidamente, pode-se dizer que a rodopsina (ou pigmento visual), composta de uma opsina associada à vitamina A (retinal), absorve a energia de um fóton através da vitamina A, induzindo a molécula a mudanças estruturais para uma forma mais estável, tornando-se uma molécula de rodopsina foto-excitada. Esse estado de excitação inicial ou batrodopsina é então convertido à lumirodopsina e dela, até metarodopsina I (meta I) e desta feita à metarodopsina II (meta II). Como resultado de todas essas alterações, a rodopsina se distorce alterando sua conformação e se une temporariamente a uma proteína G ou transducina, na forma meta II. A forma meta II, por sua vez, evolui até meta III (metarodopsina III) com a liberação de *all-trans-retinal*, seguindo-se à clivagem no sítio de ligação com uma base Schiff. O processo de branqueamento (*bleaching*), ou o processo de

isomerização do 11-cis-retinal a *all-trans*-retinal e seu subsequente desligamento da opsina, seguida pela absorção de um fóton, é finalizada a esse ponto (Hubbard and Wald, 1952 apud Gordon and Bazan, 1997). Esse processo pode ser facilmente observado ao considerar-se o fato de que retinas adaptadas ao escuro apresentam um aspecto característico alaranjado intenso mas que, após exposição luminosa, tornam-se pálidas ou sem cor como parte de um processo de *bleaching*, ou seja, um “branqueamento” após a exposição luminosa. A este ponto, poderão ocorrer diferentes seqüências, caso se considerem os cones ou os bastonetes. Ao se considerar os cones, o processo de re-isomerização ocorre dentro da retina neural, regenerando a 11-cis-retinal e repondo a rodopsina ‘branqueada’. Os bastonetes, por seu turno, serão incapazes de realizar o processo de regeneração *in situ*, dependendo então da função do EPR. É conveniente salientar aqui, que a maior parte dos estudos realizados visando descrever ou entender os eventos relacionados ao ciclo visual foram realizados em células de bastonetes ou em retinas com predominância dos mesmos, sabendo-se até a presente data muito pouco sobre como esses processos ocorrem nos cones (Gordon and Bazan, 1997). Além disso, Stecher et al. (1999) assinalam também que muito pouco se sabe sobre o processo total de reconversão de *all-trans*-retinal para 11-cis-retinal. Deve-se igualmente salientar que esse processo de re-isomerização requer gasto metabólico numa seqüência de fatos que ocorrem exclusivamente no EPR (Gordon and Bazan, 1997).

Os processos que requerem energia nos processos de foto-tradução incluem a fosforilação da rodopsina foto-ativada, a reposição de GTP hidrolisado pela transducina e a regeneração do GMPc o qual é hidrolisado pela GMPc-fosfodiesterase. A taxa de regeneração de GMPc é um dos processos que mais consomem energia durante a percepção luminosa. A seqüência intrincada de eventos que se interligam no fenômeno da percepção luminosa ou ciclo visual estão ilustrados na figura 3, disposta a seguir (Hsu and Molday, 1994).



GT: carreador de glicose tipo GLUT-1
 HMP: caminho das hexoses monofosfatadas
 RDH: desidrogenase retiniana
 GP: glutatona peroxidase
 GR: glutatona redutase
 GSSG: glutatona oxidada GSH: glutatona reduzida

Figura 3: A contribuição do metabolismo glicolítico na produção de ATP, GTP e NADPH para a fototradução e reações que requerem NADPH nas camadas fotorreceptoras externas: Na camada dos fotorreceptores externos, a glicose é transportada através da membrana plasmática por um transportador glicolítico GLUT-1 (GT). A seguir, a glicose é transformada em glicose-6-fosfato que é utilizada tanto para glicólise quanto para a produção de ATP e de GTP (em menor quantidade) para a manutenção de níveis estáveis de GMPc no escuro ou pelo ciclo das hexoses monofosfatadas (HMP), para a geração de NADPH requerida para o ciclo de redução retiniana de *all-trans*-retinal a *all-trans*-retinol pela desidrogenase retiniana (RD), seguida pelo branqueamento (*photobleaching*) da rodopsina e pela interconversão de glutatona de oxidada (GSSG) a reduzida (GSH), catalisadas pela glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GP). A energia adicional requerida pelo processo de conversão luminosa e por outros processos dependentes de alta demanda energética é obtida a partir do metabolismo aeróbico da glicose que ocorre na camada de fotorreceptores interna e transportada para a camada externa pela bomba de fosfocreatina. O ATP produzido pelo metabolismo aeróbico da glicose na mitocôndria é usado para gerar fosfocreatina (PCr) da creatina (Cr) numa reação catalisada pela creatina quinase mitocondrial (CKm). A fosfocreatina se difunde através do segmento externo onde é usada para fosforilar ADP por uma creatina quinase do tipo cerebral (CKb) para produzir ATP, o qual pode ser convertido a GTP por enzimas trifosfato kinases. Adaptado e modificado de Hsu and Molday, 1994.

1.4. A creatinaquinase e o metabolismo retiniano

Avanços recentes na compreensão dos eventos que se encadeiam na cascata de fototradução e seu entendimento bioquímico têm possibilitado uma visão mais completa desses eventos nas células fotorreceptoras dos vertebrados (Hemmer et al.1993). Sabe-se que um dos maiores consumos de energia ocorre no sítio dos fotorreceptores durante a fototradução, provocado pela regeneração do GMPc hidrolisado a partir do ATP e GTP e mediado por enzimas presentes neste segmento retiniano. Processos que também requerem ATP, tais como a regeneração cromófora dependente de NADPH, ou a fosforilação foto-dependente da rodopsina, ocorrem do mesmo modo nesses compartimentos subcelulares (Hemmer et al. 1993; Hsu e Molday 1994).

Segundo Hemmer et al.(1993) e Walliman and Hemmer (1994), a origem do ATP exigido para manter todas essas demandas permanece, até certo ponto, não muito clara e ainda está sendo discutida. É interessante lembrar, porém, que os níveis de ATP devem permanecer estáveis durante os períodos de captação de luz nos segmentos externos da camada dos fotorreceptores bastonetes. Isso sugere um sistema potente de regeneração de ATP nas proximidades destes sítios, onde os processos de percepção luminosa ocorrem (Hemmer et al.1993). Segundo López-Escallera et al. (1991) (apud Hemmer et al.1993), não poderá se atribuir à glicólise a fonte de maior de regeneração de ATP nos segmentos externos dos bastonetes, pois sabe-se que os níveis de enzimas glicolíticas são caracteristicamente baixas nesses segmentos retinianos se comparados com segmentos mais internos (Lowry et al.1961; Berger et al.1980 apud Hemmer et al. 1993). Oportuno salientar que a glicólise, nos segmentos dos fotorreceptores bastonetes, produz tanto ATP (GTP) quanto NADPH para manter a fototradução ou seja, a percepção luminosa propriamente dita, bem como os

processos dependentes de redução da glutathiona oxidada, diminuindo nesse segmento o risco de dano oxidativo (Hsu and Molday, 1994).

Ao se considerar a fosforilação oxidativa, vale ressaltar que a mesma não pode prover o ATP necessário aos segmentos externos dos bastonetes, uma vez que as mitocôndrias dos fotorreceptores estão localizadas apenas na parte mais proximal ou interna dessas células e não há disseminação interna de ATP devido à difusão prejudicada desses nucleotídeos do segmento externo para o segmento interno (Hughes et al.1972 apud. Hemmer et al.1993). Sabe-se que o GMPc e o GTP apresentam-se como moléculas muito grandes, o que dificulta a sua mobilidade através do segmento externo retiniano, ao passo que moléculas como a creatinafosfato, sendo menores em tamanho e menos negativamente carregadas, não se prendem a membranas e são mais móveis por esses segmentos (Kaupp and Koch apud Hemmer et al.1993). Em estudo publicado em 1994, Hsu e Molday apoiam a visão de que a maior concentração de mitocôndrias nos fotorreceptores está localizada na camada externa e que a creatinaquinase, a qual transfere reversivelmente grupos de fostatos de alta energia da creatinafosfato para o ADP, localiza-se nos segmentos dos fotorreceptores externos.

Sendo assim, considera-se que a fosforilação oxidativa não pode ser a fonte direta de ATP e que os fotorreceptores devem então, obter sua quota a partir de uma atividade mitocondrial retiniana não dependente diretamente de fosforilação oxidativa. Essas constatações sugerem que outras fontes de regeneração direta de ATP poderão estar associadas à fosforilação oxidativa e devem, portanto, repor o ATP consumido nos segmentos retinianos. Nas células dos músculos estriados, músculo cardíaco, neurônios, esperma, fotorreceptores, epitélios de transporte de íons, rins, miométrio, placenta, células ósseas e cartilaginosas, macrófagos, plaquetas e células tumorais ou cancerígenas (Walliman and Hemmer, 1994; Wyss and Kaddurah-Daouk, 2000) que têm em comum um alto nível de consumo metabólico, um circuito de fosfocreatina foi proposto para interrelacionar a

fosforilação oxidativa intramitocondrial ao consumo de ATP citoplásmico. Dentro desta proposta, a enzima chave para esse sistema seria a creatina quinase (ou CK, ATP creatino N-fosfotransferase), que catalisa a transferência reversível do grupo fosforila da fosfocreatina para o ADP para gerar ATP e creatina (Hemmer et al.1993; Kennedy et al.2000). Essa enzima funciona como parte de um sistema que objetiva manter o nível de ATP constante durante períodos de alto índice de consumo de energia, sendo extremamente importante para células com grande nível metabólico (Walliman and Hemmer, 1994).

Considerando-se a retina, é sabido que o consumo de ATP e o transporte de íons variam muito e constantemente em função da alta atividade dos fotorreceptores (Kennedy et al.2000). As atribuições do epitélio pigmentar, já amplamente explanadas acima, incluem várias funções críticas para a homeostasia retiniana e todas essas atividades acarretam uma taxa metabólica alta local. As taxas de fosforilação oxidativa e de glicólise foram medidas em epitélio pigmentar retiniano em meio de cultura (Kennedy et al.2000) e sugerem que, realmente, o EPR possui uma taxa alta de produção de lactato local devida à contribuição da glicólise anaeróbica, ao alto consumo de oxigênio, assim como pelo ciclo das hexoses monofosfatadas provenientes de oxidação lipídica (Hsu and Molday, 1994; Kennedy et al. 2000).

Por outro lado, também é conveniente ressaltar que somente a taxa de glicólise anaeróbica não se mostra capaz de manter a fototradução nos níveis fisiológicos conforme demonstra estudo citado por Hsu and Molday (1994) em preparação de retinas intactas de ratos e que tiveram seu metabolismo retiniano aeróbico inibido pela injeção de cianeto de potássio, mantendo apenas 50 % de sua atividade, na presença de glicose em concentrações fisiológicas (Winckler et al.1981 apud. Hsu and Molday, 1994).

Quatro isoformas da enzima CK foram descritas em preparação de cultura de epitélio retiniano humano, duas encontradas exclusivamente nas mitocôndrias e duas outras formas não mitocondriais descritas como citoplásmicas e chamadas de B-CK e M-CK (Hemmer et al.1993;

Walliman and Hemmer, 1994; Kennedy et al.2000). A isoforma B-CK é a mais amplamente distribuída das duas formas citoplásmicas e a M-CK (originalmente descrita como muscular) ocorre nas fibras de Purkinge cerebelares, células endoteliais, timo, epitélio intestinal, esperma e epitélio do ouvido interno (Walliman and Hemmer, 1994; Kennedy et al.2000). A creatinaquinase apresenta-se no citosol como um dímero, podendo assumir formas homodiméricas (MM ou BB) ou heterodiméricas (MB) já descritas (Walliman and Hemmer, 1994) como também demonstra outro ensaio sobre isoformas de CK encontradas em retina de aves (Walliman et al.1986). Em trabalho realizado em preparação de células de fotorreceptores em 1993, Hemmer et al.(1993), demonstraram a existência de um circuito de fosfocreatina operando na retina de bovinos e que requeria a presença da isoforma citosólica na camada externa de fotorreceptores e da isoforma mitocondrial encontrada apenas em camadas mais profundas. No referido estudo, demonstrou-se através da imunofluorescência, e da identificação com anticorpos anti-MiCK, a evidência de um sistema de fosfocreatina nos segmentos profundos das camadas de cones e bastonetes em fotorreceptores destes animais. Esse estudo também sugeriu que a estabilidade dos níveis de ATP durante o estágio de percepção luminosa só poderia estar associada à presença de um sistema poderoso de reposição de ATP no compartimento subcelular. Uma outra função associada à presença de CK nos segmentos externos retinianos seria a de prevenir a acidificação deste compartimento, pois tanto a fosfodiesterase quanto a guanilato ciclase, ambas presentes nestes segmentos retinianos, produzem prótons. Desse modo, ainda provê a reutilização dos prótons produzidos a partir dessas duas enzimas para a ressíntese de GMPc (Hemmer et al.1993; Dmitriev and Mangel, 2001) .

Outra função relevante do sistema CK/creatinafosfato para a atividade dos fotorreceptores seria a manutenção de níveis baixos de concentração intracelular de ADP, uma vez que seus níveis elevados implicariam em inativação de ATPases (Walliman et al.1989 apud Hemmer et al.1993).

Conforme assinalado acima, em meio de cultura de epitélio pigmentar retiniano humano (EPRH), percebeu-se uma taxa alta de produção de lactato com um nível alto de consumo de oxigênio e uma taxa alta de fluxo através da rota da hexose monofostafatada, sobretudo em presença de lipoperoxidação conseqüente à fagocitose no segmento externo. Em estudo realizado por Kennedy et al. (2000), documentou-se por eletroforese, "Western-blotting" e imunohistoquímica que as células do EPRH apresentam alta atividade da CK, e que a forma predominante de atividade de CK é a isoforma cerebral ou BB-CK. Alguma atividade de CK na isoforma M-CK foi também demonstrada e pareceu estar associada à membranas, pelo menos em uma parte. Além disso, a localização preferencial da isoforma M-CK em cultura de EPRH foi apical. A expressão das isoformas de CK tende a mudar em função da diferenciação celular (Huznar et al.1997; Perez-Jimenez et al. 1982; Robert, DuPasquier and Kobel, 1991; Trask and Birandello, 1990 apud Kennedy et al. 2000). Kennedy et al. (2000) ainda assinala que, provavelmente, a presença da M-CK em células de cultura de EPRH não se deveu à diferenciação induzida pela cultura pois também foi detectada histoquímicamente em células de EPRH nativo. Em todos os tecidos em que a função da CK foi estudada e medida, parecia haver a exigência comum de períodos de grande utilização energética de ATP. Os estudos de Walliman et al.(1986), Hemmer et al.(1993), Walliman e Hemmer (1994) e Friedman e Roberts (1994), Korge and Campbell (1994) Korge et al.(1991) apud Kennedy et al.(2000) parecem coincidir no fato de assinalar que a CK exerce uma função de disponibilidade energética espacial (*spatial energy shuttle*). Sendo assim, naquelas células em que o local de utilização da energia está estruturalmente distante das mitocôndrias, a CK pode ser usada como fonte de transporte energético (Walliman and Hemmer, 1994). A difusão de creatinafostato e não de ATP, é facilitada e possibilitada pela M-CK vinculada às membranas celulares. Estas então difundem-se para locais de alta necessidade energética na células, onde tanto a M-CK quanto a B-CK

(dependendo de qual o tecido considerado) geram ATP (Kennedy et al.2000). Os trabalhos de Walliman e Hemmer (1994) e Kennedy et al.(2000) assinalam a localização específica espacial celular das isoformas MM e BB as quais podem estar associadas às membranas intracelulares ou plasmáticas. Portanto, no EPRH, as isoformas de CK podem assim desempenhar um papel central no seu metabolismo, uma vez que podem manter níveis estáveis de ATP, viabilizando o transporte ativo de íons através do epitélio. Nele também estão armazenadas as funções de manutenção da barreira hemato-retiniana bem como a do transporte de sódio e água. O trabalho de Kennedy et al (2000) enfatiza especialmente a função metabólica do EPRH como dependente das atividades da isoforma BB-CK. A localização da outra isoforma, MM-CK, predominantemente apical, foi sugestivamente associada ao fato de poder estar ligada à função da Na^+, K^+ -ATP-ase apical, mantendo o transporte ativo de íons neste sítio de membrana.

Em estudo realizado na retina de embriões de galinhas e em proteínas codificadas por mRNA para a formação da retina destes animais nos vários estágios de desenvolvimento embrionário, Godbout et al. (1993) observaram que o nível de B-CK estava caracteristicamente alto na retina dos animais maduros, especificamente na área dos fotorreceptores, onde o nível alto de ATP é necessário para os vários processos associados à fototradução. Esses achados parecem concordantes com todos os demais estudos consultados. Porém o que surpreende neste caso, foi a verificação de que os níveis de RNA codificadores para a tradução de B-CK estavam substancialmente altos nos 3º e 5º dias de incubação e maiores do que os vistos no 19º dia, sugerindo um outro papel da B-CK não associado à fototradução. Os autores tenderam a considerar o fato possivelmente associado ao processo de crescimento do globo ocular e da retina durante o período de maturação neuro-sensorial.

Em extratos de retinas de galinhas adultas, Walliman et al.(1986) identificaram apenas duas isoformas de CK, uma do tipo cerebral (BB-CK) e outra mitocondrial (MiMi-CK) pelos

processos de eletroforese e “*immunoblots*”. Testes de imunofluorescência revelaram níveis altos de BB-CK e de MiMi-CK presentes tanto em cones como em bastonetes, mas armazenadas em compartimentos subcelulares distintos. A BB-CK, por ser a mais solúvel das duas, estava localizada nos segmentos internos e externos dos fotorreceptores, enquanto a MiMi-CK estava localizada exclusivamente dentro das mitocôndrias, na porção elipsóide do segmento interno.

Dever ser salientado, novamente, que a maior parte da CK nesses segmentos destes animais estava concentrada na camada das células dos fotorreceptores, perfazendo quase 20% do total da massa da retina. Os valores encontrados neste ensaio demonstraram que a atividade específica da CK e o seu conteúdo total dentro dos fotorreceptores foi tão alta quanto 30 μ M de fosfocreatina por minuto/miligrama e 15 mM de conteúdo, respectivamente. Esses valores se aproximaram aos determinados em outros tecidos, tais como o músculo estriado (Walliman and Eppenberger, 1985 apud Walliman et al.1986), e demonstram que a função dos fotorreceptores assim como a contração muscular e a motilidade do esperma (Tombes and Shapiro,1985 e Walliman et al.1986b apud Walliman et al.1986) dependem da hidrólise da fosfocreatina.

1.5. Objetivo Geral

Considerando que: 1- a cistinose provoca acúmulo de cistina na retina; 2- há evidências de déficit energético na cistinose; 3- a creatinaquinase é crucial para a função retiniana; 4- os mecanismos de toxicidade da cistina na retina são desconhecidos, o presente trabalho tem como objetivo principal verificar os efeitos da cistina sobre a atividade da CK de retina, com o intuito de colaborar para um melhor entendimento da gênese das lesões retinianas nesta doença.

1.6. Objetivos específicos

1- Investigar o efeito in vitro de várias concentrações de cistina sobre a atividade da creatinaquinase das frações citosólica e mitocondrial de retina de porcos Landrace adultos;

2- Investigar o efeito de vários tempos de pré-incubação sobre a atividade da creatinaquinase das frações citosólica e mitocondrial de retina de porcos Landrace adultos;

3- Investigar o efeito da cisteamina adicionada antes ou após a pré-incubação na presença de cistina, sobre a atividade da creatinaquinase das frações citosólica e mitocondrial de retina de porcos Landrace adultos.

3. MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO

Cysteamine prevents the in vitro inhibition of creatine kinase activity caused by cystine in pig retina.

Paulo Ricardo Pereira de Oliveira, Valnes Rodrigues Júnior, Virginia Cielo Rech, Angela Terezinha de Souza Wyse, Carlos Severo Dutra-Filho, Moacir Wajner, Clovis Milton Duval Wannmacher
Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author: Clovis M. D. Wannmacher

Departamento de Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos 2600 – Anexo

CEP 90.035-003 Porto Alegre RS Brazil

Fax 55 51 33165535

E-mail. clovisdw@ufrgs.br

Running title: **Cystine inhibits creatine kinase in retina**

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).

Key words: cystinosis, cystine, cysteamine, creatine kinase, retina, eye.

Summary

Cystinosis is an autosomal recessive disorder associated with lysosomal cystine accumulation caused by defective cystine efflux. Cystine accumulation provokes a variable degree of symptoms depending on the involved tissues. Visual deficit is a possible consequence of cystine accumulation in cornea and retina. However, the mechanisms by which cystine is toxic to the tissues are far from be understood. Considering that creatine kinase is a thiolic enzyme crucial for energy homeostasis, and disulfides like cystine may alter thiolic enzymes by thiol/disulfide exchange, the main objective of the present study was to investigate the effect of cystine on creatine kinase activity in cytosolic and mitochondrial fractions of the retina from adult pigs. We investigated the effects of cysteamine, the drug used for cystinosis treatment, on creatine kinase activity. We observed that cystine inhibited the enzyme activity in a dose- and time-dependent way. Results also shown that cysteamine fully prevented and partially reversed the inhibition caused by cystine, suggesting that this substance inhibits creatine kinase activity possibly by oxidation of the sulfhydryl groups of the enzyme. Although there is no definite proof of cystine within cytoplasm, there is indirect proof that it is able to escape lysosomes and come in contact with CK, at least in cytosol. Considering that creatine kinase is a crucial enzyme for retina energy homeostasis, these results provide a possible mechanism for cystine toxicity and also a new effect for the use of cysteamine in patients with cystinosis.

Introduction

Cystinosis is an autosomal recessive disorder associated with lysosomal cystine accumulation secondary to defective lysosomal cystine efflux [Gahl et al, 2001; Haq et al, 2002]. The affected gene (CTNS) encodes cystinosin, an integral lysosomal membrane protein, responsible for cystine transport out of lysosomes [Kalatzis et al, 2001]. The most common form of cystinosis, the nephropathic or infantile type, is associated with renal failure before 12 years of age, and other systemic complications in non-treated cystinotic children [Anikster et al, 1999]. Patients affected by this disease accumulate cystine in most tissues developing a variable degree of symptoms depending on the involved tissues. The treatment initiated in the first 2 years of age with the aminothioliol cisteamina (2-mercaptoethylamine), which causes parenchymal organ cystine depletion [Gahl et al, 1992], may retard the

evolution of renal disease [Broyer, 2000]. Surviving adult patients may develop involvement of skeletal muscle [Gahl et al, 1988], myocardium [Kir'ianov et al, 1992], and eye [Sanderson et al, 1974; Kaiser-Kupfer et al, 1986].

Cystinosis may affect most eye structures with variable rate of damage. Corneal crystals are pathognomonic of cystinosis [Frazier and Wong, 1968]. Cystine crystals are also present in retina [Kaiser-Kupfer et al, 1986], conjunctiva, uvea and sclera [Frazier and Wong, 1968]. A characteristic peripheral retinopathy may provoke visual impairment, whose frequency and severity increase with age, but night and color deficits precedes visual impairment [Gahl and Kaiser-Kupfer, 1987]. In ocular nonnephropathic cystinosis, some mutations may strongly affect cystinosis activity in the eye and reduce its activity in the kidney at a lesser extent [Anikster et al, 2000]

The mechanisms by which cystine is toxic to the tissues are not fully understood. However, it is well known that some enzyme activities may be altered by thiol/disulfide exchange between protein sulfhydryl groups and biologically-occurring disulfides [Gilbert,1984; Ziegler, 1985]. Considering that cystine is a disulfide, it is possible that it may act on intracellular thiol-enzymes, modifying cell function [Ziegler, 1985].

Creatine kinase (CK, EC 2.7.3.2) plays a key role in energy metabolism of tissues with intermittently high and fluctuating energy requirements, such as skeletal and cardiac muscle, and neuronal tissues like brain and retina. CK catalyses the reversible transfer of the phosphoryl group from phosphocreatine to ADP, to regenerate ATP. There are distinct CK isoenzymes, which are compartmentalized specifically in the places where energy is produced (mitochondria) or utilized (cytosol) [Wallimann et al, 1992; Wallimann et al, 1998]. Two isoforms of CK, namely brain type (BB-CK) and mitochondrial CK (Mi-CK) are found in retina [Hemmer et al, 1993]. In adult retina, most of the CK is concentrated within the photoreceptor cell layer, mainly in the myoid and ellipsoid portion of the inner segments, as

well as in the peripheral region of the outer segment [Hemmer et al, 1993]. Due to its ability to regulate ATP levels, CK in rod outer segments may be involved in ATP-mediated regulatory control of phototransduction, providing energy for the visual cycle [Hemmer et al, 1993]. It was observed that in the vicinity of the inner segments of the photoreceptor cells in rabbit retina the pH was the lowest compared to the other retinal layers [Dmitriev and Mangel, 2001]. This low pH lead the authors to suggest that the photoreceptors cells may be the primary source of protons in retina and indicates high rates of metabolism and high consume of energy. In the retinal pigment epithelium, Mi-CK isoform is plasma membrane associated, and might function in a spatial energy shuttle sustaining ion transport activity [Kennedy et al, 2000].

Therefore, considering that CK is a thiol-enzyme, and cystine is a biologically-occurring disulfide, the main objective of the present study was to investigate the effect of cystine on CK activity in the retina of adult pigs. We also investigated the effect of cysteamine, on the inhibition of the enzyme activity caused by cystine.

2. Materials and methods

2.1 Animals and reagents

Twenty male 6-month-old Landrace pigs were used in the experiments. The pigs had free access to water and to a standard commercial chow (80% maize and 20% soybean). The “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication 85-23, revised 1985) were followed in all the experiments, and the experimental protocol was approved by the Ethics Committee For Animal Research of the Federal University of Rio Grande do Sul. All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

2.2 Preparation of retina tissue

The animals were killed by electrocution and the eyes were removed and immediately placed on ice. The eyes were dissected on an ice-cooled glass plate. Time elapsed between

animal sacrifice and retina preparation was less than 1 hour. After dissection, the retina was washed in SET buffer (0.32 M sucrose / 1 mM EGTA / 10 mM Tris-HCl, pH 7.4), minced finely and homogenized in the same SET buffer (1: 20 (w / v)) with a Potter-Elvehjem glass homogenizer. 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 of the second centrifugation, containing cytosol and other cellular components as endoplasmic reticulum, was collected for determination of cytosolic CK activity. The pellet, containing mitochondria, synaptosomes, and membrane fragments, was washed twice with the same TRIS-sucrose isotonic buffer, resuspended in 100 mM MgSO₄-Trizma buffer, pH 7.5, for determination of mitochondrial CK activity. Homogenate, cytosolic and mitochondrial fractions were stored for no more than 1 week at -70⁰ C when the assay was not carried out immediately. The mitochondrial fraction was frozen and thawed three times before the enzymatic assay.

2.3 Protein determination

The protein content of the mitochondria-free heart homogenates was determined by the method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as the standard.

2.4 Enzyme assay

The reaction mixture contained the following final concentrations: 60 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 7 mM phosphocreatine, 9 mM MgSO₄, 0.07 % Triton-X-100, and approximately 1 µg protein in a final volume of 0.1 mL. After a variable time of pre-incubation at 37°C, the reaction was started by the addition of 0.3 µmol ADP. In the experiments performed to test the influence of cysteamine on the inhibition caused by cystine, this substance was added before or after the pre-incubation. 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 measure chemical hydrolysis of

phosphocreatine. The creatine formed was estimated according to the colorimetric method of Hughes (1962). 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. Experiments performed in our laboratory indicated that none of the substances added to the assay medium interfered with the color development or spectrophotometric readings (data not shown). Results were expressed as μmol of creatine formed per min per mg protein.

The experiments were performed in the following sequence:

1- Cystine was added to the incubation medium at 0.05, 0.1, or 0.15 mM final concentrations and pre-incubated for 0, 10, or 20 min;

2- Cystine was added to the incubation medium at 0.1 or 0.15 mM final concentrations and pre-incubated for 10, or 20 min; 2 mM cysteamine was added before or after pre-incubation

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Tukey test when the F values were significant. Linear regression was used to evaluate dose or time response. Data were analyzed by using the Statistical Package for Social Sciences inserted in an IBM-compatible PC computer.

3. Results

First, cystine was added to the incubation medium containing cytosolic or mitochondrial fraction at 0.05, 0.1, and 0.15 mM final concentrations and pre-incubated for 0, 10, or 20 min (Fig 1). Regression analyses showed that cystine inhibited CK activity in the mitochondrial fraction in a dose-dependent way at all times tested (0 min, $F(1,13) = 7.61$; $\beta = -0.64$; $p < 0.05$; 10 min, $F(1,13) = 10.06$; $\beta = -0.69$; $p < 0.01$; 20 min, $F(1,13) = 23.89$; $\beta = -0.82$; $p < 0.001$), and in a time-dependent way at 0.1 mM cystine, ($F(1,13) = 10.61$; $\beta = -0.67$; $p < 0.01$) and 0.15 mM cystine, ($F(1,13) = 12.21$; $\beta = -0.71$; $p < 0.01$), but not at 0.05 mM

cystine ($F(1,13) = 3.44$; $\beta = -0.44$; $p > 0.1$). Results also showed that cystine inhibited CK activity in the cytosolic fraction in a dose-dependent way when pre-incubated for 10 min ($F(1,18) = 27.86$; $\beta = -0.78$; $p < 0.0001$) or 20 min ($F(1,18) = 159.57$; $\beta = -0.95$; $p < 0.0001$) but not when assayed without pre-incubation ($F(1,18) = 0.16$; $\beta = -0.09$; $p > 0.7$), and in a time-dependent way at all concentrations tested: 0.05 mM cystine ($F(1,13) = 24.12$; $\beta = -0.81$; $p < 0.001$), 0.1 mM cystine ($F(1,13) = 45.98$; $\beta = -0.88$; $p < 0.0001$) or 0.15 mM cystine ($F(1,13) = 59.94$; $\beta = -0.91$; $p < 0.0001$).

Next, we investigated the effect of 0.1 or 0.15 mM cystine in the presence of 2 mM cysteamine added before or after pre-incubation for 10 or 20 min (Fig 2). Results showed that cystine inhibited mitochondrial CK activity when the enzyme was assayed after pre-incubation for 10 min ($F(8,27) = 4.67$; $p < 0.01$), or 20 min ($F(8,27) = 10.27$; $p < 0.0001$), whereas cysteamine fully prevented and reversed the inhibition caused by cystine on CK activity. Cytosolic CK activity was also inhibited by cystine when pre-incubated for 10 min ($F(8,36) = 4.03$; $p < 0.01$), or 20 min ($F(8,36) = 34.38$; $p < 0.0001$). Cysteamine fully prevented and reversed the inhibition caused by cystine on CK activity.. Considering that cysteamine is a protector of thiol groups, these results suggest that cystine inhibited PK activity possibly by acting on essential sulfhydryl groups of the enzyme. However, further experiments, such as disruption of the disulfide bonds, will be necessary to ensure that oxidation of sulfhydryl groups was the precise mechanism.

4. Discussion

Cystinosis is caused by a severe deficiency of CTNS gene, resulting in defective activity of cystinosin, a protein responsible for the transport of cystine out of lysosomes. Although tissue damage might depend on cystine accumulation in the affected tissues, the mechanisms of cystine toxicity are still obscures. In an attempt to investigate a possible mechanism of cystine toxicity, we performed studies on the effect of cystine on CK activity, a crucial enzyme for energy homeostasis in retina.

The transport of cystine into cells of mammalian brain is essential for the supply of cystein for glutathione synthesis. Almost 90% cystine transport occurs by a low-affinity, sodium dependent mechanism, mediated by the X (AG)-family of glutamate transporter in brain [Mc Bean and Flynn, 2001] and retina [Bridges et al, 2001]. The cystine-glutamate antiporter is a transport system that facilitates the uptake of cystine, concomitant with the release of glutamate [Pow, 2001]. The inhibition of cystine uptake caused by an increased extracellular concentration of glutamate may reduce the cellular levels of glutathione, inducing oxidative stress [Flynn and Mc Bean, 2000]. On the other hand, because cystine uptake is associated with glutamate release, an excess of extracellular cystine might contribute to release of glutamate from glial cells, inducing excitotoxicity [Warr et al, 1999]. In this case, excitotoxicity caused by glutamate release might be one of the mechanisms by which cystine leads to brain and retina damage. Although this mechanism of cystine toxicity might operate in the brain and retina, it does not explain the damage cystine provokes in the other tissues. In an attempt to investigate a mechanism that might operate in all tissues, we performed studies on the effect of cystine on CK activity, a crucial enzyme for energy homeostasis in all mammalian tissues.

In the present study, we first investigated the effects of cystine at different times of pre-incubation on the activity of CK in cytosolic and mitochondrial fractions of the retina

from adult pigs. We observed that cystine inhibited the enzyme activity in a dose- and time-dependent way in the two fractions. Next, we investigated the effect of cysteamine, a thiol group protector substance used to treat patients affected by cystinosis, on the inhibition caused by cystine. We observed that the inhibition cystine caused on CK was fully prevented and reversed by cysteamine, suggesting that cystine inhibits CK activity possibly through a reversible oxidation of the sulfhydryl groups of the enzyme.

Cystine is usually considered to be completely isolated from the cytosol within lysosomes. However, the mechanisms by which cystine accumulated in lysosomes causes cell and tissue damage is far from be understood. Mice lacking cystinosin accumulate cystine in lysosomes but do not develop Fanconi syndrome [Cherqui et al, 2002], indicating that cystine accumulation per se is not sufficient for tissue damage. It is possible that the small cystine crystals may partially disrupt the lysosomal membranes, since positive reaction for acid phosphatase, a lysosomal marker, was found to be localized at the periphery of the cystine crystals only in some of them [Koisumi et al, 1985]. Besides, ultrastructural observations in the liver and in the kidney of patients with cystinosis, and in biopsies of renal allografts from patients with cystinosis showed cystine accumulation in the cytoplasm, nucleus and cytoplasmic inclusions of dark cells, and extracellularly, indicating that cystine storage may not be limited to lysosomes [Scotto and Stralin, 1977; Spear et al, 1989]. On the other hand, renal tubule cells loaded with cystine dimethyl ester developed Fanconi's syndrome in rats secondary to a decrease in energy generation [Ben-Nun et al, 1993; Foreman et al, 1995]. Therefore, it is conceivable that CK could be inhibited in patients affected by cystinosis.

Deficient activities of several thiol enzymes, but not of non-thiol enzymes, in postmortem liver and kidney tissue from patients with nephropathic cystinosis was early reported [Patrick, 1965]. These enzymes included glucose-6 phosphate dehydrogenase. 6-

phosphogluconate dehydrogenase, hexokinase, succinate dehydrogenase, alcohol dehydrogenase, and delta-aminolevulinate dehydrase, but creatine kinase activity was not determined. However, some authors argued that these enzymes could have normal activities in the intact cells and be inhibited by cystine following lysis of the cells and partial release of the compartmentalized cystine [Schneider and Schulman, 1983]. Considering that lysosome rupture with cell death cannot explain the Fanconi Syndrome in cystinosis, because patients with acute and chronic renal failure by other causes do not present this syndrome, it is important to investigate other mechanisms for cell dysfunction in cystinosis. Inhibition of thiol enzymes like CK could be one of such mechanisms.

The CK / phosphocreatine system exerts several integrated functions in cells, such as temporary energy buffering, metabolic capacity, energy transfer, and metabolic control [Sacks et al, 1996]. This system is now recognized as an important metabolic regulator during health and disease [Wallimann et al, 1998]. 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 Ca²⁺-induced opening of the mitochondrial permeability transition pore (PTP) which leads to apoptosis [O'Gorman et al, 1997; Kroemer et al, 1998; Crompton, 1999; Schlattner and Wallimann, 2000].

CK activity decreases after exposure to agents promoting generation of free radicals [Wolosker et al, 1996; Mekhfi et al, 1996; Stachowiak et al, 1998; Arstall et al, 1998; Konorev et al, 1998] and reagents reacting with thiols [Wolosker et al, 1996; Gross et al, 1996], probably by oxidation of the sulfhydryl residues of the enzyme, or adduct formation. The active-site Cys-282 determines the sensitivity of the enzyme activity of cytosolic CK towards damage produced by free radicals [Koufen and Stark, 2000]. Mi_b-CK octamers are fairly resistant structures in the presence of free radicals of water radiolysis, but dissociation of octamers into dimers, however, permits that Cys-282 become accessible to free radical

attack [Koufen et al, 1999]. The enzyme protection by thiols are related with the ability of this reagents in to reduce a number of reacting free radicals and to modify the inactivation mechanism in such way that efficient repair of enzyme damage may be achieved.

Patients affected by cystinosis may develop ocular disease caused by cystine crystals which deposit throughout time in cornea, conjuntiva, iris and retina, where may cause retinal degeneration (Kayser-Kupfer et al. 1986). In cornea, Wong et al. (1967) argue that the shape of the cystine crystals presented in childhood cystinosis differ from those found in most other body tissues, assuming the shape of a needle. Tsilou et al.(2002) reported the needle-like shape of intracellular cystine corneal crystals visualized through an exam of indocyanine green angiography. Conjuntival crystals visualized by slit-lamp examination assume the rectangular form and its cystine nature can be confirmed by chromatography (Richler et al.1991). More likely, the needle-like shape form of cystine crystals has been attributed to the tight packing of the corneal layers. It is possible that this peculiar shape may disrupt the lysosomal membrane, delivering cystine out of lysosomes. Most reports describe general depigmentation of the retinal fundus sometimes in a patchy distribution, presenting losses of retinal pigment epithelium. The retinal depigmentation of the fundus extends from midequatorial zone to the ora serrata (Wong et al.1967; François, 1982). Apparently, there is a retinopathy, which initiates in the peripheral fundus, and tend to be symmetrical in both eyes. Wong et al. (1967) also suggest that detecting the retinal pigment disturbance may be of some diagnostic value, since this fundoscopic alteration can precede the corneal deposits. The reports of Richler et al. (1991) refer the findings of retinal epithelium mottling as well as peripheral retinal depigmentation. It is known that pigmentary retinopathy is nearly universal in patients with cystinosis and some researchers consider it to be responsible for the degradation of the visual function, being always irreversible in this type of retinopathy. Moreover, Kaiser-Kupfer et al. (1986) described abnormal retinal function as a consequence

of the continued cystine deposition in the retinal pigment epithelium with its degeneration and the secondary involvement of photoreceptor cells. Some severe retinopathy may also be accompanied by choroidal involvement with dust like pigmentation of the macula or salt and pepper macular dystrophy. Histopathological and ultrastructural examination of the eyes may show loss of retinal pigment cells (François, 1982). This author also suggests that tapetoretinal degenerations linked to metabolic disorders are due to an enzymatic deficiency. Paradoxically however, there is a lack of satisfactory explanation on how cystine accumulation affect the physiological function of the retina and its biochemistry.

Our results indicate that cystine strongly inhibits CK activity in the retina of adult pigs. Considering that creatine kinase is a key enzyme for energy homeostasis in retinal tissue, in case this effect also occurs in the retinal epithelium of patients with cystinosis, it is possible to envisage that a diminution of this enzyme activity may potentially impair energy homeostasis, contributing to the eye damage found in some patients affected by this disease. Considering that cysteamine is used in patients with cystinosis because it causes parenchymal organ cystine depletion [Gahl et al, 1992], the present data provides a possible new 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 necessary to evaluate the activity of CK in patients affected by cystinosis.

References

- Anikster Y, Shotelersuk V, Gahl WA.(1999). CTNS mutations in patients with cystinosis. Hum. Mutat. 14, 454-458.
- Anikster, Y., Lucero, C., Guo, J., Huizing, M., Shotelersuk, V., Bernardini, I., McDowell, G., Iwwata, F., Kaiser-Kupfer, M.I., Jaffe, R., Thoene, J., Schneider, J.A. and Gahl, W.A. (2000). Ocular nonocular cystinosis: clinical, biochemical, and molecular correlations. *Pediatr. Res* 47: 17-23.

- Arstall, M.A., Bailey, C., Gross, W.L., Bak, M., Balligand, J.L., Kelly, R.A., (1998). Reversible *S*-nitrosation of creatine kinase by nitric oxide in adult rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 979–988.
- Ben-Nun, A, Bashan, N, Potashnik, R, Cohen-Luria, R, and Moran, A, (1993). Cystine loading induces Fanconi Síndrome in rats: in vivo and vesicle studies, *Am. J. Physiol.* 265, 839-844.
- Bridges, C.C., Kekuda, R., Wang, H., Prasad, P.D., Mehta, P., Huang, W., Smith, S.B., Ganapathy, V. (2001). Structure, function, and regulation of human cystine/glutamate transporter in retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 47-54.
- Broyer, M. (2000). Cystinosis from childhood to adulthood. *Nephrologie* 21, 13-18
- Cherqui, S., Sevin, C, Hamard, G., kalatzis, V., Sich, M., Pequignot, M.O., Gogat, K., Abitbol, M., Broyer, M., Gubler, MC., and Antignac, C. (2002). Intralysosomal cystine accumulation in mice lacking cystinosin, the protein defective in cystinosis. *Mol. Cell. Biol* 22, 7622-7632.
- Crompton, M., (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 341, 233–249.
- Dmitriev, A.V. and Mangel, S. (2001). Circadian clock regulation of the pH in the rabbit retina. *J Neurosci.* 21, 2897-2902.
- Flynn, J., McBean, G.J. (2000). Kinetic and pharmacological analysis of L- (³⁵S)cystine transport into rat brain synaptosomes. *Neurochem. Int.* 36, 513 - 521.
- Foreman, J W, Benson, L L, Wellons, M, Avner, E D, Sweeney, W, Nissim, I, and Nissim, I (1995). Metabolic studies of rat renal tubule cells loaded with cystine: the cystine dimethylester model of cystinosis, *J. Am. Soc. Nephrol.* 6, 269-272.
- François, J. (1982). Metabolic tapetoretinal degenerations. *Surv. Ophthalmol.* 6,293-333
- Frazier, P.D.. and Wong, V.G. (1968). Cystinosis. Histologic, and crystallographic examination of crystals in eye tissues. *Arch. Ophtalmol.* 80, 87-91

- 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.
- Gahl, W A, Dalakas, M C, Charnas, L, Chen, K T, Pezeshkpour, G H, Kuwabara, T, Davis, S L, Chesney, R W, Fink, J, and Hutchison, H T (1988). Myopathy and cystine storage in muscles in a patient with nephropathic cystinosis. *N. Engl. J. Med.* 319, 1461-1464.
- Gahl, W A, Thoene, J G, Schneider, J A.(2001). Cystinosis: a disorder of lysosomal membrane transport. In *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*, (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. eds): 8th ed., pp 5085-5108, McGraw-Hill, New York,.
- Gahl, W.A., and Kaiser-Kupfer, M.I. (1987). Complications of nephropathic cystinosis after renal failure. *Pediatr. Nephrol.* 1, 260-268
- Gilbert, HF (1984). Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange. *Methods Enzymol.* 107, 330-351
- 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.
- Haq MR, Kalatzis V, Gubler MC, Town MM, Antignac C, Van't Hoff WG, Woolf AS. (2002). Immunolocalization of cystinosin, the protein defective in cystinosis. *J. Am. Soc Nephrol.* 13, 2046-2051
- Hemmer, W., Riesinger, I., Wallimann, T., Eppenberger, H.M., and Quest, A.F. (1993). Brain-type creatine kinase in photoreceptor cell outer segments: role of a phosphocreatine circuit in outer segment energy metabolism and phototransduction. *J. Cell Sci.* 106, 671-683

- Hughes, B.P. (1962). A method for 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.
- Kaiser-Kupfer, M.I., Caruso, R.C., Minkler, D.S., Gahl, W.A. (1986). Long-term ocular manifestations in nephropathic cystinosis. *Arch Ophthalmol.* 104, 706-711
- Kaiser-Kupfer, M.I., Gazzo, M.A., Datiles, M.B., Caruso, R.C., Kuehl, E.M. and Gahl, W.A. (1990) A randomized placebo-controlled trial of cysteamine eye drops in nephropathic cystinosis. *Arch Ophthalmol.* 108,689-93.
- Kalatzis, V, Cherqui, S, Antignac, C, Gasnier, B (2001). Cystinosin, the protein defective in cystinosis, is a H⁺-driven lysosomal cystine transporter. *EMBO J.* 20, 5949-5949.
- Kennedy, B.G., Haley, B.E., and Mangini, N.J. (2000). Creatine kinase in human retinal pigment epithelium. *Exp. Eye Res.* 70, 183-190.
- Kir'ianov, NA, Bazhenov, EL, and Stetsenko, EV (1992). Cystinosis in an adult. *Arkh. Patol.* 54, 34-36.
- Koisumi, F, Koeda, H T, Wakaki, K., Matumoto, M, Kobashi, K, Akao, T and 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.
- Konorev, E.A., Hogg, N., Kalyanaraman, B., (1998). Rapid and irreversible inhibition of creatine kinase by peroxynitrite. *FEBS Lett.* 427, 171–174.
- Koufen, P., Rück, A., Brdiczka, D., Wendt, S., Wallimann, T., Stark, G. (1999). Free radical induced inactivation of creatine kinase: influence on the octameric and dimeric states of the mitochondrial enzyme (Mi_b-CK). *Biochem. J.* 344, 413-417.
- Koufen, P., Stark, G. (2000). Free radical induced inactivation of creatine kinase: sites of interaction, protection, and recovery. *Biochim. Biophys. Acta* 1501, 44-50.
- Kroemer, G., Dallaporta, B., Resche-Rigon, M., (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 619–642.

- Lineweaver, H, and Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56, 658-666.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 – 275.
- McBean, G. J, Flynn, J. (2001). Molecular mechanisms of cystine transport, *Biochem. Soc. Trans.* 29, 717 - 722.
- Mekhfi, H, Veksler, V, Mateo, P, Maupoil, V, Rochette, L, Ventura-Clapier, R. (1996). Creatine kinase is the main target of reactive oxygen species in cardiac myofibrils. *Circ. Res.* 78, 1016-1027.
- O’Gorman, E., Beutner, G., Dolder, M., Koretsky, A.P., Brdicska, D., Wallimann, T., (1997). The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett.* 414, 253–257.
- Patrick, A D. (1965). Deficiencies of SH-dependent enzymes in cystinosis. *Clin. Sci.* 28, 427-443.
- Pow, D. W.(2001). Visualizing the activity of the cystine-glutamate antiporter in glial cells using antibodies to amino adipic acid, a selectively transported substrate, *Glia*, 34, 27 – 38.
- Richler M., Milot, J., Quigley, M. and O'Regan, S. (1991) Ocular manifestations in ocular cystinosis. *Arch Ophthalmol.* 109. 359-362.
- Saks, V.A., Ventura-Clapier, R., Aliev, M.K. (1996). Metabolic control and metabolic capacity: two aspects of creatine kinase functioning in the cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1274, 81-88.
- Sanderson, P.O., Kuwabara, T., Stark, W.J., Wong, V.J., and Collins, E.M.K. (1974). Cystinosis: A clinical, histopathologic, and ultrastructural study. *Arch. Ophthalmol.* 91, 270-274
- Schlattner, U., Wallimann, T., (2000). Octamers of mitochondrial creatine kinase isoenzymes differ in stability and membrane binding. *J. Biol. Chem.* 275, 17314–17320.

- Schneider, J.A. and J.D. Schulman, J D. Cystinosis. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Stanbury, J.B. Wyngaarden, J B, Fredrickson, D S, Goldstein, J L, Brown, M S. eds);, 5th ed., pp 1844-1866, McGraw-Hill, New York.
- Scotto, J M, and Stralin, H G (1977). Ultrastructure of the liver in a case of childhood cystinosis, *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histol.* 377, 43-48.
- Spear, G S, Gubler, M C, Habib, R, and Broyer, M (1989). Dark cells of cystinosis: occurrence in renal allografts, *Hum. Pathol.* 20, 472-476.
- 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.
- Tsilou, E., Csaky, K., Rubin, B., Gahl, W. and Kaiser-Kupfer, M. (2002) Retinal Visualization in an eye with corneal crystals using indocyanine green video angiography. *Am.J. Ophthalmol.* 134. 123-125.
- Wallimann, T., Dolder, M., Schlattner, U., Eder, M., Hornemann, T., O’Gorman, E., Ruck, E., Brdiczka, D. (1998). Some new aspects of creatine kinase (CK): compartmentation, structure, function and regulation for cellular and mitochondrial bioenergetics and physiology. *Biofactors* 8, 229-234.
- Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K. (1992). Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase in tissues with high and fluctuating energy demands: the ‘phosphocreatine circuit’ for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.* 281, 21- 40.
- Warr, O., Takahashi, M., and Atwell, D. (1999) Modulation of extracellular glutamate concentration in rat brain slices by cystine-glutamate exchange. *J. Physiol.* 514, 783-793.
- Wolosker, H., Panizzutti, R., Engelender, S., (1996). Inhibition of creatine kinase by S-nitrosoglutathione. *FEBES Lett.* 392, 274–276.

Wong, V., G., Lietman, P.S. and Seegmiller, J.E., (1967). Alterations in pigment epithelium in cystinosis. *Arch Ophthalmol.* 77, 361-369.

Ziegler, DM (1985). Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 305-329.

Figure 1: Effect of cystine on creatine kinase activity in cytosolic (A) and mitochondrial (B) fractions from retina of adult pigs.

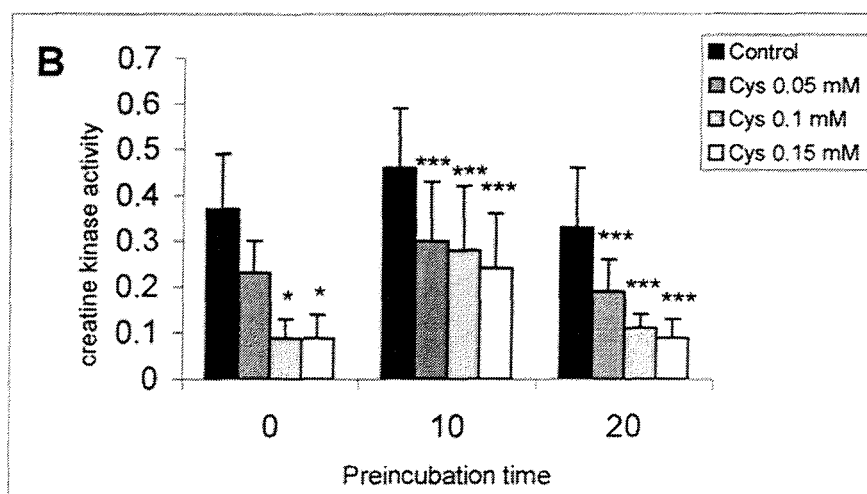
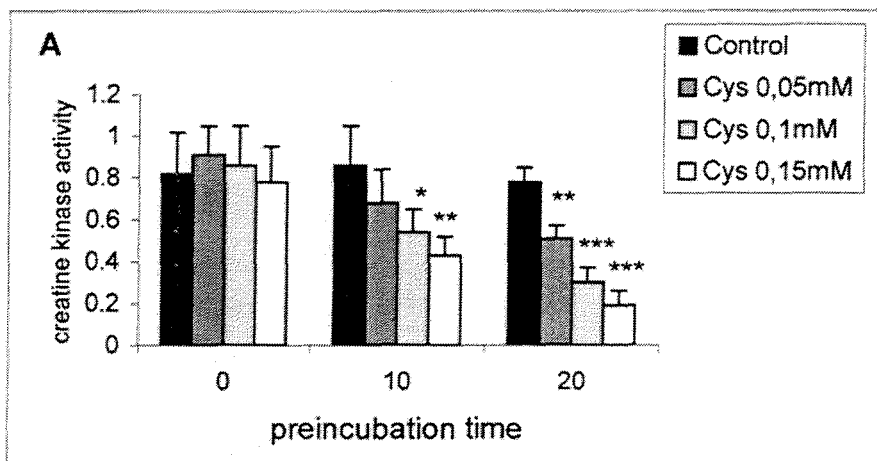
Data are mean \pm SD for 5 independent experiments performed in triplicate.

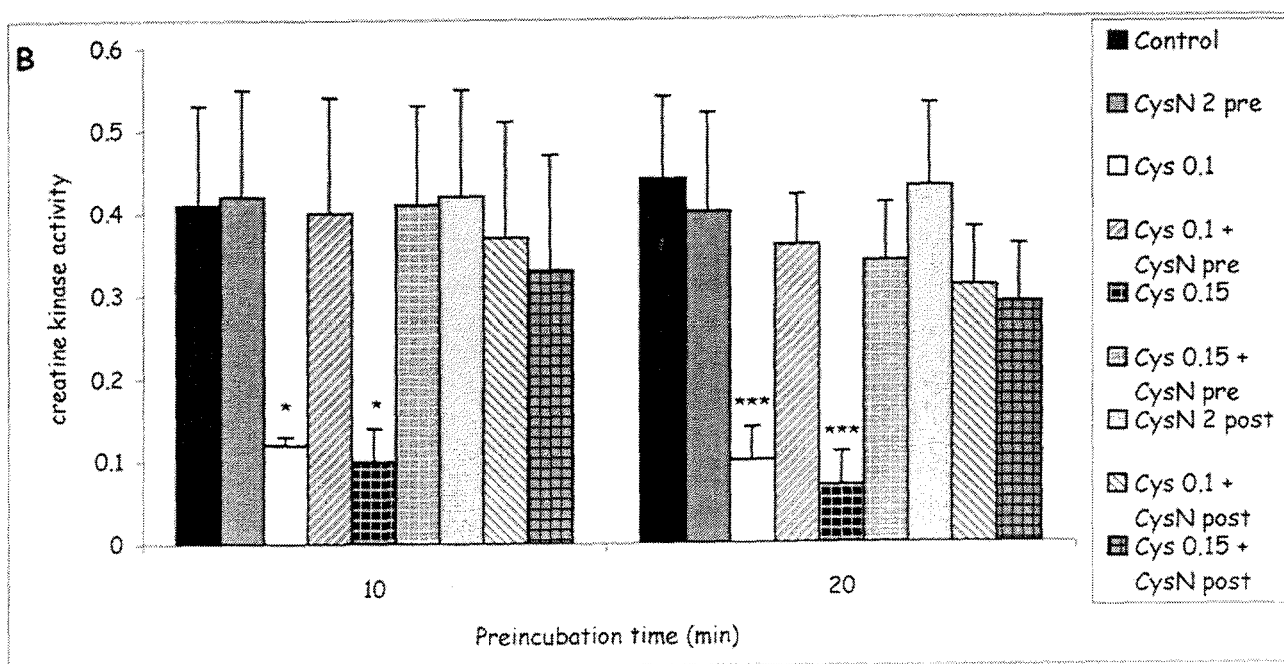
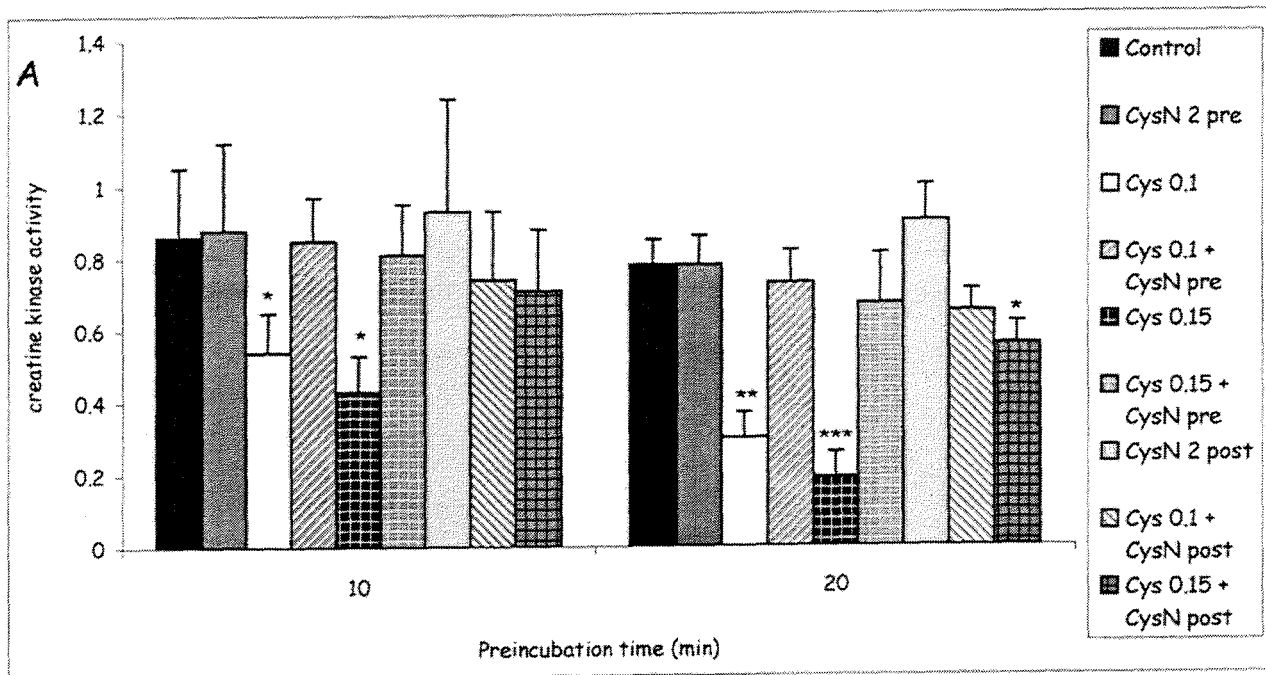
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to the other groups (Tukey test).

Figure 2: Effect of 2 mM cysteamine (cysN) added before (pre) and after (post) pre-incubation with cystine for 10 or 20 min on creatine kinase activity in cytosolic (A) and in mitochondrial (B) fraction in the presence or absence of 0.1 or 0.15 mM cystine (cys).

Data are means \pm SD for 5 independent experiments performed in triplicate.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to the other groups (Tukey test).





Date: Wed, 08 Sep 2004 15:03:00 +0100
Content-Type: text/plain; charset="US-ASCII"
Content-Transfer-Encoding: 7bit
X-Priority: 3

Experimental Eye Research

Title: Cysteamine prevents the in vitro inhibition of creatine kinase activity caused by cystine in pig retina.

Authors: Paulo Ricardo Pereira de Oliveira, Dr. ; Valnes Rodrigues Júnior, Dr.; Virginia Cielo Rech, Dr.; Angela Terezinha de Souza Wyse, Dr.; Carlos Severo Dutra-Filho, Dr.; Moacir Wajner, Dr.; Clovis Wannmacher

Article Type: Research Article

Dear Dr. Wannmacher,

Your submission referenced above has been received by Experimental Eye Research.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an Author. The URL is <http://ees.elsevier.com/yexer/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to Experimental Eye Research.

Yours sincerely,

Caroline ten Wolde

Journal Manager Experimental Eye Research (EER)

Email: exer@elsevier.com

Elsevier Editorial System: <http://ees.elsevier.com/yexer>

EER Online: <http://www.elsevier.com/locate/yexer>

4. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Um amplo leque de reações que envolvem os processos visuais tem sido identificado e conectado com o processo de tradução visual ou percepção luminosa. A creatinaquinase parece estar envolvida na manutenção de níveis altos de ATP/ADP, assim como na regeneração imediata do ATP em inúmeras reações nas quais ele é consumido na retina. A regeneração ATP-dependente e a fosforilação do foto-pigmento da rodopsina pela rodopsina quinase, a $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{ATP-ase}$ e outras enzimas ATP-dependentes da membrana celular do fotorreceptor, o transporte de componentes entre as camadas internas e externas dos fotorreceptores dependentes de ATP, a retração da actinmiosina dos fotorreceptores conduzida por ATP, percebida em algumas espécies de peixes (Porrello et al.1983), a síntese e o armazenamento de neuro-transmissores, e mesmo o metabolismo do GMPc, constituem algumas das reações retinianas nas quais o ATP está envolvido (Walliman et al.1986). Se considerarmos que uma fonte direta ou indireta de ATP ou GTP na retina reside na atividade da CK e que o circuito de fosfocreatina, possivelmente, esteja envolvido conforme explanado anteriormente, a sua inibição parcial ou total pode resultar em um quadro de colapso metabólico e funcional *in loco*. Isso sem considerar a produção de NADPH retiniano e, indiretamente, a manutenção de níveis ideais de glutathiona, suficientes para a prevenção de dano oxidativo, na qual a CK parece exercer um papel de destaque (Hsu and Molday,1994). Em um plano geral, outro estudo citado por Cherqui et al.(2002) em coelhos, percebeu-se que a presença de cistina intra-lisossômica renal causou uma diminuição significativa nas concentrações intracelulares de ATP com inibição da atividade da $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATP-ase}$.

Na cistinose, os olhos podem ser entendidos como uma janela para as alterações observadas em todo o organismo, uma vez que revelam a severidade do comprometimento da fisiologia através de um “espelho” natural, que são as córneas de ambos os olhos. Tradicionalmente na sua forma ocular não nefropática, a cistinose aparece evidenciada pela

formação de cristais no estroma corneano, visíveis facilmente ao exame oftalmológico. Interessante informar que a intensidade com que os cristais se acumulam na córnea costuma refletir a severidade com que o gene CTNS, causador da cistinose, se manifesta (Gahl et al.2000). Qualquer que seja a causa desencadeadora da formação de cristais corneanos, essa complicação traz consigo conseqüências clínicas importantes, tais como a fotofobia, sintoma manifesto quase que universalmente após a primeira década de vida. Outras alterações de função ocular abrangem um importante blefarospasmo e erosões recorrentes de córnea, as quais, eventualmente, podem acarretar a necessidade de um transplante corneano. Entre as alterações retinianas vistas ao exame, destaca-se a presença de cristais intra-retinianos, com alterações pigmentares na mácula e na periferia, conforme já salientado, mas que podem ser mais evidenciáveis com o uso da angiografia por indocianina verde (Tsilou et al.2002a).

O tratamento mais aceito atualmente consiste no uso de cisteamina oral (Cystagon®), o qual pode baixar o conteúdo de cistina intracelular em cerca de 95% (Gahl, 2003). Afirma-se que possui eficácia comprovada na prevenção da deterioração renal glomerular, na melhoria do crescimento, na prevenção do hipotireoidismo, entre outros. Isto posto, e o que a literatura em geral acena, ou seja, de que embora não haja uma cura específica para a cistinose, esta pode ser tratada com a reposição das perdas renais e a administração oral de hidrocloreto de cisteamina, o que se sabe até o presente, é que pacientes recebendo cisteamina a longo termo melhoram de suas manifestações gerais de crescimento e de disfunção renal (Kaiser-Kupfer et al.1990) É oportuno destacar que embora tenha mostrado sucesso ao controlar as manifestações sistêmicas da doença, o uso oral de cisteamina não mostra resultados oculares tão animadores, conforme relatam Kaiser-Kupfer et al (1990), sobretudo no que diz respeito às manifestações corneanas da doença.

O modo de interação bioquímica da cisteamina com a cistina consiste na clivagem da cistina intra-lisossômica, gerando um dissulfeto de cistina-cisteamina, o qual sai dos

lisossomos via um transportador de lisina. Entretanto, a necessidade de doses regulares espaçadas (quatro vezes ao dia) e um número considerável de efeitos colaterais, tais como intolerância gástrica e odor nauseante persistente tornam difícil a sua administração oral (Cherqui et al.2002).

No que diz respeito aos olhos, não há evidências inequívocas ou unanimemente aceitas de que a cisteamina seja capaz de eliminar completamente as manifestações oculares da doença em seus vários estágios. (Cantani et al., 1983). Richler et al.(1991) pontuam a necessidade do uso de instilações constantes nas córneas de pacientes afetados em frequência horária.

Por outro lado, Dureau et al.(2003) relatam o acompanhamento de 29 pacientes cistinóticos, no período de 1990 até 2000, com tratamento de cisteamina oral e tópica (colírios). Entre a sintomatologia reportada nestes pacientes incluía-se fotofobia com perda da acuidade visual, iniciada aos 10 anos de idade e tornada intensa aos 15, infiltrados periféricos de córnea e retinopatia presente em 51,7% de todos eles, sendo que em 3 casos, com maculopatia adicional. Foi observado que o uso de cisteamina oral pode ter determinado a diminuição de infiltrados retinianos presentes nos pacientes deste estudo.

Nosso estudo utilizou-se de um modelo experimental em retinas de olhos de porcos recém-abatidos. Optou-se por este modelo animal, pois constitui, juntamente com coelhos e bovinos, um dos animais mais frequentemente requisitados para modelos experimentais das doenças oculares humanas (Jackson et al.2003). Primeiramente, estudaram-se os efeitos de diferentes concentrações de cistina, em tempos distintos de pré-incubação, sobre a atividade da creatinaquinase em frações mitocondriais e citosólicas da retina fresca de porcos adultos. A partir disto, verificou-se que a cistina foi capaz de inibir a ação da CK nas duas frações de um modo dose e tempo dependente. No segundo momento de nosso estudo, investigou-se se a cisteamina seria capaz de prevenir ou reverter a inibição causada pela cistina na atividade da

CK. Nossos resultados sugeriram que a ação da cisteamina no extrato de retina foi eficiente em prevenir ou reverter a inibição da enzima estudada *in vitro*, conforme resultados anexos.

Entretanto, embora se saiba dos resultados francamente animadores da ação da cisteamina sobre os problemas decorrentes da deterioração glomerular (Gahl,2003) ou na melhoria dos sintomas corneanos (Gahl et al.2000;Kaiser-Kupfer,1986) e outros, não se pode ainda afirmar decisivamente o local de ação ou modo típico com que a cisteamina mostra-se apta a preservar a ação da enzima na retina. Conforme enfatizado anteriormente, a CK e o sistema de fosfocreatina cumprem o propósito de provimento energético àqueles tecidos cujo local de utilização energética situa-se estruturalmente longe das mitocôndrias (Walliman and Hemmer (1994). Levando-se em conta a multiplicidade do metabolismo retiniano e sua complexidade anatômica e bioquímica, soaria precipitado irmos além do fato de que em nosso modelo experimental houve uma bem sucedida prevenção da cisteamina na inibição exercida pela cistina sobre a CK. Esses resultados favoráveis iniciais são o que dispomos nessa primeira etapa. Outros estudos e testes precisam ser feitos e pluralizados, considerando-se, por exemplo, os vários tipos celulares retinianos, o montante de CK disponível, a existência e o montante de enzimas anti-oxidantes dispostas a prevenir a inibição da CK causada pela cistina.

Por fim, há que se acrescentar que em toda a revisão de literatura concernente ao tratamento específico das alterações retinianas pela cistinose há lacunas a serem preenchidas, uma vez que a própria natureza da alteração degenerativa presente na cistinose suscita controvérsias entre os trabalhos consultados. François (1982) parece em alguns momentos considerá-la uma degeneração tapeto-retiniana verdadeira, tecendo analogias entre ela e a retinose pigmentar. Mas isso é um assunto que parece longe de se encerrar de forma definitiva.

Em resumo, os resultados obtidos no presente trabalho permitem chegar às seguintes conclusões:

1-A cistina inibe de maneira dependente de concentração a atividade *in vitro* da creatinaquinase das frações citosólica e mitocôndrica de retina de porcos Landrace adultos;

2- A cistina inibe de maneira dependente de tempo de pré-incubação a atividade *in vitro* da creatinaquinase das frações citosólica e mitocôndrica de retina de porcos Landrace adultos;

3- A cisteamina previne e reverte a inibição da atividade da creatinaquinase causada pela cistina nas frações citosólica e mitocôndrica de retina de porcos Landrace adultos.

Em função destas conclusões, nossos resultados abrem a perspectiva para continuarmos a investigação perseguindo os seguintes objetivos:

1- Verificar os efeitos da cistinose quimicamente induzida sobre o tecido retiniano em algum modelo experimental animal. Determinar padrões de dano degenerativo e verificar reversibilidade de lesões de retina com a administração de cisteamina.

2- Verificar os efeitos da cistina sobre o metabolismo retiniano considerando-se a ação da creatinaquinase e sua interação com as enzimas anti-oxidantes, em conjunto.

3- Estudar os mecanismos de ação e comprometimento preferencial nas células da retina *in vitro* e/ou *in vivo* pela cistina e sobre o complexo da cadeia respiratória retiniana e modificações possíveis nos componentes da cadeia de foto-tradução.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS

ANIKSTER, Y., LUCERO, C., GUO, J., HUIZING, M., SHOTELERSUK, V., BERNARDINI, I., McDOWELL, G., IWATA, F., KAISER-KUPFER, M., JAFFE, R., THOENE, J., SCHNEIDER, J.A. and GAHL, W. (2000) Ocular non-nephropathic cystinosis: clinical, biochemical and molecular correlations. *Pediatr. Res.* **47**, 17-23.

BOK, D. (1993) The retinal pigment epithelium: A versatile partner in vision. *J. Cell Sci Suppl.* **17**, 189-195.

CANTANI, A., GIARDINI, O. and CANTANI, C. (1983) Nephropathic cystinosis: Ineffectiveness of cysteamine therapy for ocular changes. *Am. J. Ophthalmol.* **5**, 713-14.

CHABRE, M. and DETERRE, P. (1989). Molecular mechanism of visual transduction. *Eur. J. Biochem.* **179**, 255-66.

CHERQUI, S., SEVIN, C., HAMARD, G., KALATZIS, V., SICH, M., PEQUIGNOT, M.O., GOGAT, K., ABITBOL, M., BROYER, M., GUBLER, M.C. and ANTIGNAT, C. (2002) Intralysosomal cystine accumulation in mice lacking cystinosin the protein defective in cystinosis. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7622-7632.

DANTAS, A.M. and PATRÃO, A.L. (1992): Revisão anatomo-fisiológica do aparelho visual, p31-35 In Maria de Lourdes Veronose Rodrigues: *Oftalmologia Clínica*. 1ª edição, Rio de Janeiro. Ed. Cultura Médica.

DMITRIEV, A.V. and MANGEL, S. (2001). Circadian clock regulation of the pH in the rabbit retina. *J Neurosci.* **21**, 2897-2902.

DUREAU, P., BROYER, M., DUFIER, J.L.(2003). Evolution of ocular manifestations in nephropathic cystinosis: a long-term study of a population treated with cysteamine. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* **40**: 142-146.

FRANÇOIS, J. (1982). Metabolic Tapetoretinal Degenerations. *Surv. Ophthalmol.* **6**, 293-333.

GAHL, W.A.(2003). Early oral cysteamine therapy for nephropathic patients. *Eur J. Pediatr. Suppl.* **1**:38-41.

GAHL, W.A., KUEHL, E.M., IWATA, F., LIDBLAD, A. and KAISER-KUPFER, M. (2000) Corneal crystals in nephropathic cystinosis: natural history and treatment with cysteamine eyedrops. *Mol Genet Metab.* **71**. 100-120.

GAHL, W.A., THOENE, J. and SCHNEIDER, J.A.(2001) Cystinosis: a disorder of lysosomal membrane transport, p.5085-5108. In C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly and D. Valle (ed.), *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed., vol.3. McGraw-Hill, New York, NY.

GODBOUT, R. (1993) Identification and characterization of transcripts present at elevated levels in the undifferentiated chicken retina. *Exp. Eye. Res.* **56**, 95-106.

GORDON, W.C. and BAZAN, N.G. (1997) Retina, p.144-275 In Harding, J., *Biochemistry of the eye*, 1st ed., Chapman and Hall Medical, London.

HEMMER,W., RIESINGER, I., WALLIMAN, T., EPPENBERGER, H. M. and QUEST, F.G.(1993). Brain-type creatine-kinase in photoreceptor cell outer segments: role of a phosphocreatine circuit in outer segment energy metabolism and phototransduction. *J Cell Science*. **106**. 671-684.

HSU, S. and MOLDAY, R.S. (1994) Glucose metabolism in photoreceptor outer segments. *J. Biol. Chem*. **27**, 17954-17959.

JACKSON,T.L., ANTCLIFF,R. and MARSHALL,J.(2003). Human retinal molecular weight exclusion limit and estimate of species variation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **44**. 2141-2146.

KAISER-KUPFER,M.I., CARUSO, R.C., MINKLER and GAHL, W.A.(1986). Long term ocular manifestations of nephropathic cystinosis. *Arch. Ophthalmol*.**104**, 706-11.

KAISER-KUPFER, M.I., GAZZO, M.A., DATILES, M.B., CARUSO, R.C., KUEHL, E.M. and GAHL, W.A.(1990) A randomized placebo-controlled trial of cysteamine eye drops in nephropathic cystinosis. *Arch. Ophthalmol*.**108**.689-93.

KENNEDY, B.J.,HALEY,E.B. and MANGINI N.J.(2000).Creatine kinase in human retinal pigment epithelium .*Exp Eye Res*.**70**.183-90.

KOLB,H., FERNÁNDEZ, E. and NELSON, R. (2002). Webvision:The organization of the retina and visual system. <http://www.webvision.med.utah.edu>.

PORRELLO, K., CANDE, Z.W. and BURNSIDE, B. (1983) N-ethylmaleimide-modified subfragment and heavy meromiosin inhibit reactivated contractor in motile models of retinal cones. *J Cell Biol.* **96**, 449-454.

RICHLER M., MILOT, J., QUIGLEY, M. and O'REGAN, S. (1991) Ocular manifestations in ocular cystinosis. *Arch. Ophthalmol.* **109**. 359-362.

SCOTTO, J M, and STRALIN, H G (1977). Ultrastructure of the liver in a case of childhood cystinosis, *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histol.* **377**, 43-48.

SPEAR, G. S, GUBLER, M C, HABIB, R, and BROYER, M (1989). Dark cells of cystinosis: occurrence in renal allografts, *Hum. Pathol.* **20**, 472-476.

SHOTELERSUK, V., LARSON, D., ANIKSTER, Y., McDOWELL, G., LEMONS, R., BERNARDINI, I., GUO, J, THOENE, J and GAHL, W.(1998)CTNS mutations in an american-based population of cystinosis patients. *Am .J. Hum. Genet.* **63**. 1352-1362.

STECHEH,H., GELB,M.,SAARI,J. and PALCZEWSKI,K. (1999). Preferential release of 11-cis-retinol from retinal pigment epithelial cells in the presence of cellular retinaldehyde-binding protein. *J Biol Chem.* **13**. 8577-8585.

TSILOU, E., CSAKY, K., RUBIN, B., GAHL, W. and KAISER-KUPFER, M. (2002) Retinal Visualization in an eye with corneal crystals using indocyanine green video angiography. *Am .J.Ophthalmol.***134**. 123-125.

TSILOU, E.T., RUBIN. B., REED, G., IWATA, F., GAHL, W and KAISER-KUPFER, M. (2002) Age-related prevalence of anterior segment complications in patients with infantile nephropathic cystinosis. *Cornea*. **21**. 173-176.

WALLIMAN,T. and HEMMER, W. (1994) Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol. Cell. Biochem*. **133-134**. 193-220.

WALLIMANN,T., WEGMANN,G., MOSER, H., HUBER, R., and EPPENBERGER, H.M. (1986) High content of creatine kinase in chicken retina: compartmentalized localization of creatine kinase isoenzymes in photoreceptor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **83**, 3816-3819.

WAN,W.L.,MINCKLER,D.S. and RAO, N.A.(1986) Pupillary block glaucoma associated with childhood cystinosis. *Am. J. Ophthalmol* **101**,700-705.

WONG, V., G., LIETMAN, P.S. and SEEGMILLER, J.E., (1967). Alterations in pigment epithelium in cystinosis. *Arch Ophthalmol*. **77**, 361-369.

WYSS, M and KADDURAH-DAOUK,R.(2000). Creatine and Creatine Metabolism. *Physiol Rev*. **3**, 1107-1213.

Este mundo é inconcluso;

Além, há continuação.

Invisível, como a música,

Evidente, como o som.

Emily Dickinson