

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

**EFEITO DA CISTEAMINA SOBRE ALGUNS PARÂMETROS
DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÓRTEX CEREBRAL DE
RATOS SUBMETIDOS A MODELO EXPERIMENTAL DE
CISTINOSE**

Tese de Doutorado

Adriana Kessler

Porto Alegre, 2008

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

**EFEITO DA CISTEAMINA SOBRE ALGUNS PARÂMETROS
DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÓRTEX CEREBRAL DE
RATOS SUBMETIDOS A MODELO EXPERIMENTAL DE
CISTINOSE**

Adriana Kessler

Orientador: Prof. Dr. Clovis Milton Duval Wannmacher

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, como
requisito para a obtenção do grau de DOUTOR EM BIOQUÍMICA

Porto Alegre, 2008

Dedico esta tese à minha amada tia,
Valdemarina Bidone de Azevedo e Souza
(*in memorium*), fonte de inspiração
na busca incessante do conhecimento.

“Aprendi que a melhor homenagem que posso
fazer a quem se foi é viver como ele gostaria
que eu vivesse: bem, integralmente, saudavelmente,
com alegrias possíveis e projetos até impossíveis”.

Lya Luft

Agradecimentos

A Deus pela vida e por tudo o que ela me tem dado.

Ao meu grande mestre e orientador **Prof. Clovis Wannmacher**, pelo exemplo de educador e pesquisador, por ter me ensinado a ser mais paciente e tolerante; e por me fazer acreditar que, no final, “tudo daria certo” (desde que se trabalhasse muito, é claro...)!

Aos demais professores do Grupo de Erros Inatos do Metabolismo: **Ângela, Dutra e Moacir**, pela convivência agradável e pelas valiosas contribuições nos seminários.

Às colegas e amigas **Luciane e Virginia**, pelo apoio nas horas difíceis, mas principalmente pelos bons momentos que passamos juntas.

À minha eterna bolsista **Micheli**, pelo companheirismo e pela incansável ajuda nas longas madrugadas e finais de semana de trabalho experimental.

Aos bolsistas e voluntários do laboratório: **Denise, Elenara, Gustavo, Maria Fernanda, Rodrigo e Tatiana**, pela amizade e pela ajuda nas diversas etapas deste trabalho.

Ao amigo **Vasyl**, pela parceria e pela disponibilidade nas horas de aperto.

À todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para a execução deste trabalho.

Ao **Centro Universitário Feevale**, pelo apoio financeiro.

Aos meus pais **José Carlos e Lindalva**, pelo exemplo de caráter e honestidade e por serem o meu porto seguro.

Ao **Denis**, pelo amor incondicional, pelas conquistas compartilhadas e pelo incentivo nos momentos de angústia.

SUMÁRIO

PARTE I.....	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE FIGURAS	4
LISTA DE TABELAS	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
I. INTRODUÇÃO	6
I.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO	6
I.1.1 Sinais Clínicos e Laboratoriais	7
I.1.2 Tratamento.....	7
I.1.3 Estudos de Erros Inatos do Metabolismo em Animais.....	8
I.2 CISTINOSE.....	8
I.2.1 Aspectos Históricos.....	9
I.2.2 Lisossomos.....	10
I.2.3 Cistina.....	10
I.2.4 Armazenamento de Cistina na Cistinose	11
I.2.5 Classificação da Cistinose	11
I.2.6 Achados clínicos e patologia	12
I.2.6.1 Envolvimento renal.....	12
I.2.6.2 Envolvimento do sistema nervoso central	13
I.2.7 Diagnóstico	14
I.2.8 Tratamento.....	14
I.3 CISTEAMINA.....	14
I.3.1 Mecanismo de depleção da cistina pela cisteamina	15
I.3.2 Dosagem e efeitos colaterais.....	16
I.4 ESTRESSE OXIDATIVO	17
I.4.1 Compostos oxidantes: radicais livres e espécies reativas.....	17
I.4.2 Fontes oxidativas.....	18
I.4.3 Problemas do encéfalo.....	21
I.4.4 Marcadores do estresse oxidativo	23
I.4.4.1 Lipídios	23

I.4.4.2 Proteínas.....	25
I.4.4.3 DNA.....	25
I.4.5 Sistemas de defesa antioxidantes	26
I.4.5.1 Defendendo o encéfalo	26
I.4.5.1.1 Defesas enzimáticas	26
I.5 ESTRESSE OXIDATIVO E ERROS INATOS DO METABOLISMO	28
PARTE II.....	29
II. OBJETIVOS	30
III. MÉTODO E RESULTADOS	31
III.1 CAPÍTULO I.....	31
III.2 CAPÍTULO II	46
PARTE III	55
IV. DISCUSSÃO	56
V. CONCLUSÕES.....	61
VI. PERSPECTIVAS	64
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

PARTE I

RESUMO

A cisteamina (CSH) é um aminotiol redutor formado a partir da via catabólica da coenzima A e é precursora da taurina, um aminoácido abundante no encéfalo e que possui propriedades antioxidantes. A CSH é uma droga depletora de cistina e, quando utilizada precocemente no tratamento da cistinose, retarda a evolução da doença. A cistinose é uma doença metabólica causada pela deficiência do transportador lisossomal de cistina levando à formação de cristais de cistina em diversos órgãos e tecidos, incluindo o sistema nervoso central. Estudos realizados com fibroblastos de pacientes cistinóticos e com células tubulares renais sobrecarregadas com cistina dimetil éster (CDME), um análogo da cistina utilizado para estudar a patogênese da cistinose, sugerem que a apoptose está aumentada nesta doença. Considerando que o estresse oxidativo é um conhecido indutor de apoptose, o objetivo inicial deste estudo foi investigar um possível efeito antioxidante da CSH sobre vários parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens. Para os experimentos *in vitro*, foram utilizados ratos Wistar de 22 dias não tratados e a CSH foi testada nas concentrações finais de 0,25 a 1,0 mM. Os resultados mostraram que a CSH reduziu a lipoperoxidação (LPO), a oxidação do 2,7 -dihidroclorofluoresceína (DCFH), a carbonilação protéica e a atividade da catalase (CAT); e aumentou a atividade da glutationa peroxidase (GSH-Px). No tratamento agudo, ratos de 22 dias de vida receberam três injeções subcutâneas de CSH (0,26 µmol/g de peso corporal), com intervalo de 3 h entre elas e foram mortos 1 h após a última injeção. Os ratos do grupo controle receberam o mesmo volume de solução salina. A CSH reduziu a LPO e a atividade da GSH-Px; e aumentou a carbonilação protéica e a atividade da CAT. A próxima etapa da investigação foi verificar os efeitos da co-administração de CSH sobre os mesmos parâmetros de estresse oxidativo estudados anteriormente em córtex cerebral de ratos submetidos a um modelo experimental de cistinose por administração crônica de CDME. Os animais receberam duas injeções diárias intraperitoneais de CDME (1,6 µmol/g de peso corporal) e/ou subcutâneas de CSH (0,26 µmol/g de peso corporal) do 16º ao 20º dia de vida. Os ratos foram mortos no 21º dia de vida, metade 1 h depois da última injeção e os outros 12 h após a última injeção. O CDME induziu a LPO, a carbonilação protéica e estimulou a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), GSH-Px e CAT. O CDME diminuiu a relação tióis/dissulfetos. Por sua vez, a co-administração de CSH restabeleceu o equilíbrio redox e preveniu o estresse oxidativo induzido pela administração de CDME. Quando analisados em conjunto, os resultados sugerem que a CSH, além de ser uma droga depletora de cistina intralisossomal, pode ser um sequestrador de radicais livres, reduzindo a lesão celular por apoptose. Se estes efeitos também ocorrerem nos pacientes cistinóticos, a CSH também pode retardar a evolução da cistinose pelo seu efeito antioxidante.

ABSTRACT

Cysteamine (CSH) is a reducing aminothioliol generated from the coenzyme A catabolic pathway and is the main source of taurine, an abundant amino acid in the brain with antioxidant properties. CSH is a cystine-depleting drug and when used earlier in the treatment of cystinosis, extends life of affected patients. Cystinosis is a metabolic disease caused by deficiency of the lysosomal cystine carrier leading to the formation of cystine crystals in many organs and tissues, including central nervous system. Studies performed in fibroblasts of cystinotic patients and in kidney cells loaded with cystine dimethyl ester, a cystine analog used for studying the pathogenesis of cystinosis, suggest that apoptosis is enhanced in this disease. Considering that oxidative stress is a known apoptosis inducer, the first objective of this study was to investigate a possible antioxidant effect of CSH on several parameters of oxidative stress in the brain of young rats. For the *in vitro* experiments, non-treated 22-day-old rats were used and CSH was added to the assay at 0.25 to 1.0 mM final concentrations. Results showed that CSH reduced lipoperoxidation (LPO), 2,7-dihydrodichlorofluorescein oxidation (DCFH), carbonyl content of proteins and catalase (CAT) activity, and increased glutathione peroxidase activity (GSH-Px). In the acute treatment, 22-day-old rats received three subcutaneous injections of CSH (0.26 $\mu\text{mol/g}$ body weight) at 3 h intervals and were sacrificed 1 h after the last injection. In the control group, rats received the same volumes of 0.85% NaCl. Cysteamine decreased LPO and GSH-Px activity, and increased the carbonyl content of proteins and CAT activity. The next step of this investigation was to verify the effects of CSH co-administration in the same oxidative stress parameters studied before, in cerebral cortex of rats submitted to an experimental model of cystinosis. The animals were injected intraperitoneously twice a day with 1.6 $\mu\text{mol/g}$ body weight cystine dimethylester and/or subcutaneously 0.26 $\mu\text{mol/g}$ body weight cysteamine from the 16th to the 20th postpartum day. Rats were sacrificed in the 21st day, half 1 h after the last injections, and the others 12 h after the last injection. CDME induced LPO, protein carbonylation, and stimulated superoxide dismutase (SOD), GSH-Px and CAT activities. CDME significantly decreased thiol/disulfide ratio. CSH co-administration restored the redox status and prevented the oxidative stress induced by CDME administration. Taken together, the results suggest that CSH act not only as an intralysosomal cystine-depleting drug but also as a scavenger of free radicals, reducing cell damage by apoptosis. If these effects also occur on cystinotic patients, the antioxidant effect of CSH may contribute to retard the evolution of the disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de depleção da cistina pela cisteamina	16
Figura 2 - Sistema de transporte de elétrons mitocondrial	19
Figura 3 - Etapas da lipoperoxidação	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies reativas de oxigênio	18
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT	Catalase
CDME	Éster de dimetil cistina
CK	Creatinaquinase
CSH	Cisteamina
DCFH	2'7'-dihidrodiclorofluoresceína
EIM	Erros inatos do metabolismo
ER	Espécies reativas
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GSH-Px	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HNE	4-hidroxinonenal
L [•]	Radical lipídico
LOO [•]	Radical peroxila
LOOH	Hidroperóxido lipídico
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
MMP	Permeabilização da membrana mitocondrial
O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
PK	Piruvatoquinase
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

I. INTRODUÇÃO

I.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

O termo erros inatos do metabolismo (EIM) foi proposto em 1908 por Sir Archibald Garrod, referindo-se a quatro doenças: alcaptonúria, cistinúria, pentosúria e albinismo. Esses distúrbios bioquímicos humanos são alterações genéticas que se manifestam pela diminuição ou mesmo ausência da função de uma proteína, geralmente uma enzima. As alterações resultam em bloqueio de rotas metabólicas, podendo ocorrer tanto o acúmulo de metabólitos tóxicos como a falta de produtos essenciais, acarretando em doença subsequente (Bickel, 1987).

De acordo com Stambury et al. (1983), todos os processos bioquímicos no organismo estão sob controle gênico e estão sujeitos a serem realizados de forma deficiente sempre que uma mutação gênica alterar a função de uma proteína.

Até o momento foram descritos mais de 500 EIM (Scriver et al., 2001), a maioria deles envolvendo processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Benson e Fenson, 1985), causando um grande número de defeitos com quadros clínicos variados, podendo ser desde assintomáticos, até tão graves que levam à morte neonatal. Os EIM são graves e geralmente se manifestam na infância, sendo que os sinais e os sintomas encontrados são semelhantes aos de muitas doenças infantis.

Apesar de raros quando considerados individualmente, os EIM são relativamente freqüentes em seu conjunto, podendo ocorrer aproximadamente um em cada mil recém-nascidos vivos. As técnicas de investigação bioquímica têm colaborado para a descoberta de novos erros inatos do metabolismo, esclarecendo cada vez mais os já conhecidos.

1.1.1 Sinais Clínicos e Laboratoriais

Embora a sintomatologia dos EIM dependa do grau de deficiência enzimática, da área do metabolismo e dos tecidos afetados, alguns sinais e sintomas aparecem com maior frequência nesses distúrbios (Burton, 1988).

As principais manifestações clínicas são deficiência de crescimento, dificuldade alimentar, vômitos, diarreia, letargia ou coma, hipotonicidade ou hipertonicidade, convulsões, dificuldade respiratória e apnéia, icterícia, hepatomegalia, fascies grosseira, dismorfias, odor anormal na pele e na urina, anormalidades oculares, cabelos anormais e macroglossia, atraso no desenvolvimento psicomotor e, principalmente, retardo mental progressivo.

Entre os achados laboratoriais mais comuns no período neonatal estão: acidose metabólica, hipoglicemia, hiperamonemia, transaminases elevadas, substâncias redutoras na urina, teste de cloreto férrico positivo, cetonúria, neutropenia, trombocitopenia, anemia e linfócitos vacuolados em esfregaço periférico (Scriver et al., 2001).

1.1.2 Tratamento

O tratamento dessas doenças será tanto mais bem sucedido quanto mais precoce for o seu diagnóstico e pode ser conduzido de diversas maneiras:

- ✘ Limitando a entrada do precursor (como na fenilcetonúria, evitando a ingestão de fenilalanina);
- ✘ Suplementando o metabólito ausente (como no hipotireoidismo, administrando a tiroxina);
- ✘ Inibindo a formação da substância acumulada (como na gota, administrando alopurinol para inibir a xantina oxidase);
- ✘ Inibindo o acúmulo de determinada substância (como na Doença de Wilson, impedindo a formação de cobre com o uso de drogas);
- ✘ Controlando fatores desencadeantes (evitando substâncias como fármacos);

- ✘ Aumentando a atividade enzimática (como na homocistinúria, aumentando as doses do cofator, a piroxina);
- ✘ Suplementando a proteína não enzimática deficiente (como na hemofilia, administrando o fator VIII);
- ✘ Suplementando a enzima deficiente.

1.1.3 Estudos de Erros Inatos do Metabolismo em Animais

Nenhum modelo animal, químico ou genético, é capaz de reproduzir completamente a doença humana devido às peculiaridades genéticas e ambientais de cada espécie. Entretanto, os modelos permitem estudar a evolução da doença e isolar cada um dos fatores patogênicos presumíveis e associá-los da maneira desejada, obtendo informações impossíveis de conseguir nos pacientes (Bulfield, 1980; Herschkowitz, 1988). Neste sentido, o estudo de modelos animais de erros inatos do metabolismo humano parece ser de grande valia para investigar a patogenia e auxiliar na compreensão de alguns aspectos dessas doenças.

No caso da cistinose, doença a ser abordada neste estudo, um modelo animal baseado na sobrecarga lisossomal por éster de dimetil cistina (CDME) tem sido utilizado na tentativa de esclarecer os mecanismos que levam o acúmulo de cistina a provocar dano celular. (Foreman et al., 1987; Ben-Nun et al., 1993).

1.2 CISTINOSE

A cistinose é uma doença rara, autossômica recessiva, multisistêmica, caracterizada por desordem no transporte lisossomal, levando ao acúmulo intracelular de cistina (Gahl et al., 2001). A primeira descrição clínica ocorreu por volta dos anos 1900, mas somente em 1998 o gene causador, CTNS, foi identificado (Kalatzis e Antignac, 2003). Este gene codifica a proteína transportadora lisossomal de cistina, a cistinosina, que, quando deficiente ou

ausente, leva à formação de cristais de cistina em vários tecidos (Kleta e Gahl, 2004; Tsilou et al., 2006).

A incidência da cistinose infantil tem sido estimada em 1 caso a cada 100.000-200.000 nascidos vivos. Entretanto, uma incidência maior tem sido reportada em regiões como leste da França (Província de Brittany), Reino Unido, Alemanha e Canadá (Quebec). Em Brittany, a incidência é de 1 caso a cada 26.000 nascidos vivos (Gahl et al., 2001).

1.2.1 Aspectos Históricos

Os primeiros casos foram reportados em 1903 por Abderhalden. Após mais ou menos trinta anos, Fanconi na Suíça, de Toni na Itália e Debré na França descreveram uma desordem renal tubular caracterizada por glicosúria, proteinúria, acidose renais e raquitismo hipofosfatêmico chamada Síndrome de Fanconi. No final dos anos quarenta, Dent quantificou a extensão da poliúria, glicosúria, fosfatúria e proteinúria, notando uma aminoacidúria generalizada nos pacientes afetados em relação às concentrações normais do aminoácido no plasma. Em 1952, Bickel et al. descreveram a associação entre Síndrome de Fanconi e lesão glomerular progressiva. As investigações clínicas em cistinose tiveram início em 1967 através da cromatografia. Essa técnica revelou concentrações plasmáticas de cistina normais em pacientes cistinóticos, mas quantidades elevadas de cistina livre intracelular. Com o passar do tempo, várias técnicas mostraram que havia cistina armazenada nos lisossomos das células de indivíduos afetados (Gahl et al., 2002). O próximo estágio foi investigar a hipótese de que o transporte de pequenas moléculas através da membrana lisossomal era mediado por um transportador. Para tanto, leucócitos polimorfonucleares foram carregados com altas concentrações de cistina por exposição ao CDME, e assim como ocorreu com outros aminoácidos metilésteres, o mesmo foi hidrolisado especificamente nos lisossomos, formando metanol e cistina livre. Túbulos proximais isolados de ratos e coelhos com sobrecarga de CDME desenvolveram deficiência de reabsorção proximal tubular semelhante àquela

encontrada na Síndrome de Fanconi (Foreman *et al.*, 1987; Ben-Nun *et al.*, 1993). Em 1995, o gene da cistinose foi localizado no cromossomo 17p por um grupo de investigadores. Em 1998, o gene foi isolado e várias mutações foram identificadas.

1.2.2 Lisossomos

Os lisossomos são organelas citoplasmáticas envoltas por membranas que contém uma variedade de enzimas capazes de hidrolizar proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídios. Os lisossomos funcionam como um sistema digestivo da célula, servindo tanto para degradar material captado do exterior da célula como para digerir componentes obsoletos da própria célula. Na sua forma simples, são vistos como vacúolos esféricos e densos, podendo apresentar variações consideráveis no tamanho e na forma de acordo com os diferentes materiais que foram captados para digestão (Cooper, 2001).

As doenças relacionadas aos lisossomos apresentam efeitos cumulativos e resultam em degeneração dos tecidos, podendo levar a óbito. As doenças lisossomais de origem genética são de dois tipos principais: aquelas relacionadas à síntese ou função dos lisossomos e as que são associadas à disfunção de uma enzima específica (Carvalho e Recco-Pimentel, 2007).

A importância de sistemas de transporte em mediar a saída dos metabólitos dos lisossomos torna-se especialmente clara nas doenças genéticas letais, como a cistinose nefropática (Pisoni *et al.*, 1990; Hirota *et al.*, 2004).

1.2.3 Cistina

A cistina é um dissulfeto formado pela oxidação de duas moléculas do aminoácido cisteína. Cistina e cisteína participam da reação reversível de oxi-redução. Na presença de oxigênio (O₂), a cisteína é rapidamente oxidada à cistina. A cisteína é tanto um precursor da síntese de proteínas quanto um produto da hidrólise de proteínas e pode ser incorporada nos tióis livres como a glutatona (GSH).

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

No citosol estão presentes muitos sistemas redutores de cistina, a maioria da cist(e)ína existe na forma tiólica livre. Isto é mantido como cisteína por GSH-dissulfeto transidrogenases agindo, conjuntamente, com altas concentrações celulares de glutatona reduzida. Cistina e GSH participam de uma reação para formar cisteína e dissulfeto cisteína-GSH. Uma segunda reação entre GSH e o dissulfeto produz cisteína e glutatona oxidada (GSSG; Gahl et al., 2001).

1.2.4 Armazenamento de Cistina na Cistinose

A concentração plasmática, bem como a absorção intestinal de cistina é normal na cistinose. No entanto, o armazenamento de cistina na cistinose é intracelular, com formação de cristais nos rins, fígado, pulmões, pâncreas, intestino, apêndice vermiforme, conjuntiva e córnea, retina, linfonódos, tireóide, timo, músculo, placenta, intestinos, fígado, cérebro, entre outros. O acúmulo de cistina e a formação de cristais ocorrem em diferentes momentos do desenvolvimento do indivíduo (Gahl et al., 2002).

1.2.5 Classificação da Cistinose

Existem várias formas clínicas da doença (infantil ou clássica, juvenil ou intermediária e ocular, não nefropática ou adulta), baseadas na idade de início e na severidade dos sintomas.

A forma mais severa, a cistinose infantil, se manifesta geralmente entre 6 e 12 meses de idade com perda de fluidos e eletrólitos, aminoacidúria, glicosúria, fosfatúria, acidose renal

tubular, raquitismo e retardo no crescimento, sendo responsável por 95% dos casos de cistinose registrados nos Estados Unidos da América.

A lesão glomerular resulta em falência renal entre os 9 e 10 anos de idade. Primeiramente pensava-se que a cistinose era uma doença puramente renal, mas com o advento da terapia de substituição renal, as complicações oculares, hepáticas, musculares e no sistema nervoso central foram sendo reportadas (Kalatzis e Antignac, 2003).

Outros dois tipos, menos severos e menos frequentes são a cistinose juvenil e a ocular. Indivíduos com a forma juvenil apresentam o dano glomerular entre 12 e 15 anos de idade, mas não evoluem com tubulopatia severa e retardo no crescimento. A progressão para o estágio final da doença renal é lenta e ocorre em idades variadas.

Pessoas com cistinose ocular não possuem anormalidades renais.

1.2.6 Achados clínicos e patologia

Segundo Gahl et al. (2002), as manifestações iniciais da cistinose geralmente aparecem alguns meses após o nascimento. Os sinais e sintomas são variados e incluem primeiramente poliúria, polidipsia, desidratação e retardo no crescimento, podendo evoluir para hipotireoidismo, fotofobia, insuficiência renal crônica, miopatia, disfagia, cegueira, diabetes melito, hipogonadismo masculino, disfunção pulmonar e calcificações no sistema nervoso central. Porém, o envolvimento renal é a principal característica clínica da doença.

1.2.6.1 Envolvimento renal

Pacientes com cistinose nefropática são aparentemente normais ao nascimento. O desenvolvimento progride normalmente até a segunda metade do primeiro ano de vida, quando começa a ocorrer retardo no crescimento e aumento de peso e a criança acometida se alimenta pouco, fica irritadiça, urina e bebe em excesso e apresenta episódios de acidose e desidratação. Os sintomas iniciais da cistinose são resultado da falência tubular renal na

reabsorção de moléculas pequenas causando a Síndrome de Fanconi. A cistinose é a causa mais comum de Síndrome de Fanconi em crianças. Essa síndrome é caracterizada por perda urinária excessiva de proteínas de baixo peso molecular, glicose, aminoácidos, fosfato, cálcio, magnésio, sódio, potássio, carnitina, bicarbonato, água, entre outras.

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

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

1.2.6.2 Envolvimento do sistema nervoso central

As correlações clínicas do armazenamento de cristais de cistina no sistema nervoso central incluem atrofia cerebral na tomografia computadorizada, convulsões, tremores, déficit cognitivo, retardo mental ou síndrome piramidal, perda de memória recente e fraqueza de extremidades (Vogel et al., 1990).

1.2.7 Diagnóstico

O diagnóstico é feito pela medida do conteúdo de cistina em leucócitos. Os níveis de cistina são medidos com o uso de um ensaio sensível e específico envolvendo proteínas ligadoras de cistina ou com o uso de cromatografia de coluna de troca iônica. Em indivíduos normais, uma preparação de leucócitos contém menos do que 0,2 nmol de meia cistina/mg de proteína, enquanto pacientes com cistinose nefropática podem chegar a valores de 2,0 nmol de meia cistina/mg de proteína. (O conteúdo de cistina é expresso em unidades de meia cistina porque os métodos iniciais de quantificação envolveram uma redução de cistina seguida de um ensaio para cisteína).

O diagnóstico pré-natal pode ser executado em cultura de amniócitos ou em amostra de vilosidades coriônicas. Testes para a medida do conteúdo de cistina na placenta e leucócitos do cordão umbilical podem ser realizados imediatamente após o nascimento.

1.2.8 Tratamento

Para que o tratamento da cistinose nefropática seja bem sucedido, o diagnóstico deve ser precoce. Caso a doença não seja adequadamente tratada na infância, a criança desenvolverá insuficiência renal crônica havendo necessidade de diálise e transplante. A terapêutica depende do estágio da doença e pode ser paliativa (reposição de eletrólitos, suplementação de cálcio, fosfato de sódio e vitamina D, reposição de carnitina e hormônio de crescimento) ou específica (cisteamina).

1.3 CISTEAMINA

O tratamento de escolha existente para a cistinose é a terapia oral com cisteamina (CSH, β -mercaptoetilamina), uma droga que reduz, aproximadamente em 95%, os níveis intracelulares de cistina (Gahl, 2003).

A CSH é um aminotiol natural e proveniente da degradação da coenzima A. Em humanos, é o único aminotiol capaz de ser reconhecido pelo transportador de cisteamina lisossomal (Pisoni et al., 1995) e, assim, de acordo com Kooistra et al. (1982), atravessar a membrana lisossomal tanto na forma reduzida quanto na oxidada (cistamina).

Ensaio clínico têm demonstrado que a cisteamina, quando indicada precocemente, retarda a deterioração glomerular, melhora o crescimento linear, previne o hipotireoidismo e diminui o conteúdo de cistina muscular. Portanto, a CSH parece prevenir as complicações não renais da cistinose encontradas em pacientes adultos não tratados como, por exemplo, a miopatia distal, disfagia e envolvimento do sistema nervoso central (Gahl, 2003). Muitos pacientes sobrevivem aos trinta anos sem necessidade de transplante renal. Se o diagnóstico for estabelecido e a terapia com CSH for iniciada antes do aparecimento dos sintomas, o prognóstico da função glomerular é bom, mas a disfunção tubular ainda se desenvolve cedo (Gahl et al., 2002).

Ao analisar a concentração de creatinina, levando em consideração a idade, em pacientes tratados com CSH oral e em pacientes não tratados, é possível perceber o efeito favorável de depleção precoce e prolongada de cistina em pacientes cistinóticos (Gahl et al., 2002).

A cisteamina tem um odor forte e liga-se à mucosa oral e obturações dentárias. Por essa razão, cápsulas de bitartrato de cisteamina (**Cystagon**, Mylan) são preferíveis quando as crianças tiverem idade suficiente para engolir as cápsulas. Para bebês, o conteúdo das cápsulas pode ser dissolvido em suco e dado com outros medicamentos.

1.3.1 Mecanismo de depleção da cistina pela cisteamina

A CSH entra nos lisossomos via um transportador específico para aminotióis ou aminosulfetos, clivando cistina em cisteína e em um dissulfeto misto cisteína-cisteamina (Fig. 1). A cisteína sai livremente dos lisossomos cistinóticos através de transportadores

específicos, enquanto o dissulfeto cisteína-cisteamina, que é estruturalmente análogo à lisina, é retirado da membrana lisossomal pela porta de lisina, via transportador correspondente (Kalatzis e Antignac, 2003). No citoplasma, a CSH e a cisteína são reduzidas pela glutatona, permitindo o ciclo da CSH entre os lisossomos e o citoplasma. Em cada ciclo, é removido 1 mol de meia cistina por mol de CSH (Gahl et al., 2002).

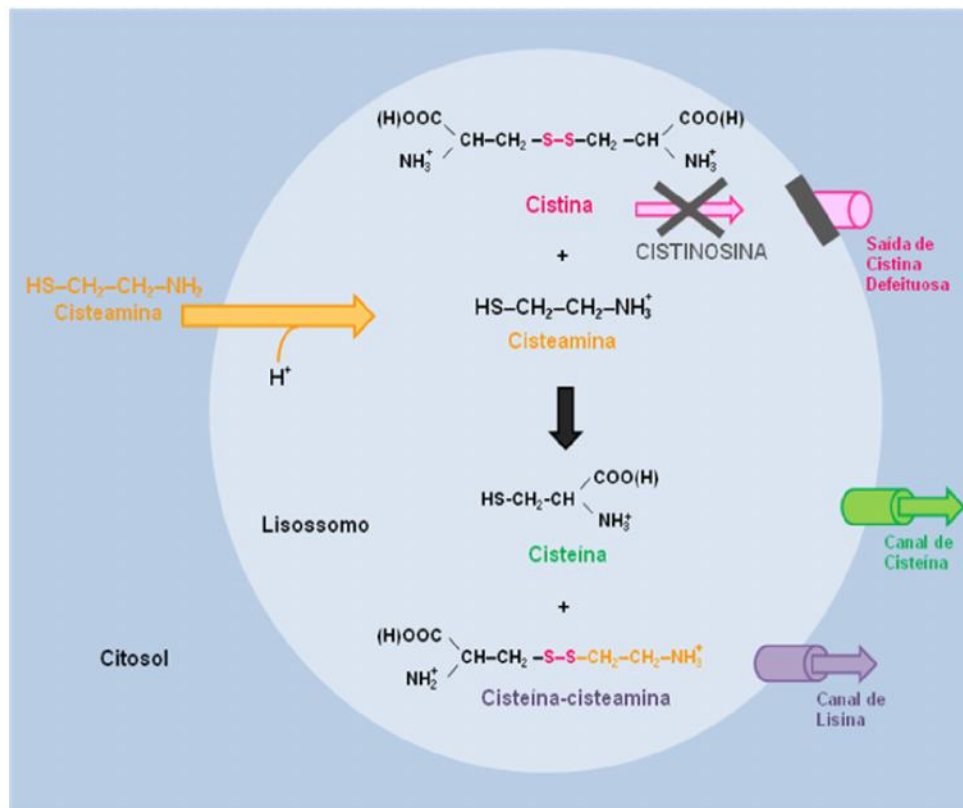


Figura 1: Mecanismo de depleção da cistina pela cisteamina (fonte: adaptado de Gahl et al., 2001).

1.3.2 Dosagem e efeitos colaterais

Altas doses de CSH são necessárias para uma máxima eficácia na fase inicial da doença. Além disso, a droga deve ser ingerida a cada seis horas, provocando efeitos indesejáveis como intolerância digestiva e um persistente odor nauseante, em qualquer dose, e sonolência em doses excessivamente altas. Em casos raros, pode ocorrer urticária alérgica, convulsões e neutropenia.

A terapia com CSH deve ser iniciada com a dose diária de 10mg/Kg de peso corporal a cada seis horas e aumentada semanalmente até a dose de 60 a 90mg/kg de peso corporal por dia. Em alguns casos, são requeridas doses mais altas para a obtenção de uma depleção satisfatória de cistina devido a absorção deficitária e inativação rápida da droga.

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

Os humanos necessitam de O₂ para sobreviver, porém a hiperóxia produz toxicidade (Chavko et al., 2003). Um dano oxidativo basal ao DNA, lipídios e proteínas ocorre em todos os tecidos, até mesmo em ar ambiente (Halliwell e Whiteman, 2004).

De acordo com Halliwell (2006), em organismos aeróbios, há um equilíbrio entre a produção de várias espécies reativas (ER) e defesas antioxidantes, visto que essas ER possuem importantes funções biológicas, como defesa contra infecções e sinalização da resposta inflamatória. Entretanto, o excesso de ER pode causar dano tecidual e posterior doença crônica.

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

1.4.1 Compostos oxidantes: radicais livres e espécies reativas

Segundo Halliwell e Gutteridge (2007), *radical livre* é qualquer espécie capaz de existir independentemente, que possua um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica. Essa configuração faz dos radicais livres espécies altamente instáveis, de meia vida relativamente curta e quimicamente muito reativas. O radical livre mais simples é o átomo de hidrogênio, pois o mesmo tem apenas um elétron que é, portanto, desemparelhado.

Existem compostos derivados do O₂ que são tão reativos quanto os radicais livres (Tab. 1), mas que não possuem elétrons não pareados na última camada, como por exemplo, o

peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o oxigênio *singlet* (O₂¹Δg) e o ácido hipocloroso (HOCl). Assim sendo, a expressão *espécies reativas de oxigênio* (ERO) é utilizada para incluir tanto radicais de O₂ como substâncias não radicalares, que são agentes oxidantes e/ou facilmente convertidos em radicais (Halliwell e Cross, 1994; Halliwell, 2006). Todos os radicais livres de O₂ são ERO, mas nem todas ERO são radicais livres. Além dessas, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo o óxido nítrico (NO•) e o peroxinitrito (ONOO⁻) os principais representantes.

Tabela 1: Espécies reativas de oxigênio (fonte: adaptada de Halliwell, 2006)

<i>Radicais livres</i>	<i>Não-radicais</i>
ERO	ERO
Superóxido, O ₂ ^{•-}	Peróxido de hidrogênio, H ₂ O ₂
Hidroxila, OH•	Ácido hipobromoso, HOBr
Hidroperoxila, HO ₂ [•]	Ácido hipocloroso, HOCl
Carbonato, CO ₃ ^{•-}	Ozônio, O ₃
Peroxila, RO ₂ [•]	O ₂ ¹ Δg <i>singlet</i>
Alcoxila, RO•	Peróxidos orgânicos, ROOH
Radical dióxido de carbono, CO ₂ ^{•-}	Peroxinitrito, ONOO ⁻
O ₂ ¹ g ⁺ <i>singlet</i>	Peroxinitrato, O ₂ NOO ⁻
	Ácido peroxinitroso, ONOOH
	Peroxomonocarbonato, HOOCO ₂ ⁻
	Nitrosoperoxicarbonato, ONOOCO ₂ ⁻

1.4.2 Fontes oxidativas

A célula está exposta a uma grande variedade de ERO oriundas de fontes exógenas, como radiação ultra-violeta, ultra-som, alimentos, drogas, poluentes e toxinas, e endógenas como células (neutrófilos), enzimas produtoras de ERO direta (NO sintase) e indiretamente (xantina oxidase), metabolismo (mitocôndria) e doenças (Kohen e Nyska, 2002).

A obtenção de energia pelos organismos aeróbicos é feita através da fosforilação oxidativa. A principal fonte de radicais livres é o sistema de transporte de elétrons mitocondrial (Fig. 2), sendo o seu principal sítio de formação o complexo citocromo c-ubiquinona (Tyler, 1975; Turrens, 2003).

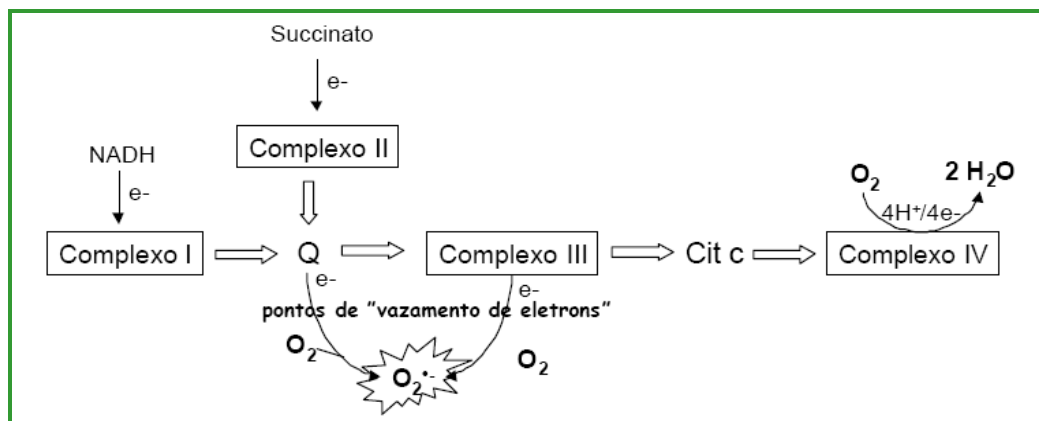
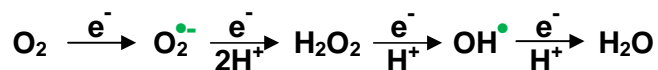


Figura 2: Sistema de transporte de elétrons mitocondrial (fonte: Carvalho et al., 2003).

A citocromo oxidase utiliza 80% do O_2 captado pelo corpo humano, adicionando 4 elétrons em cada molécula de O_2 gerando duas moléculas de água:



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

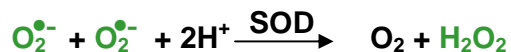


Segundo Juurlink (1997), em torno de 1 a 3% de todo o O_2 consumido pela mitocôndria resulta na formação de radicais superóxido. O ânion superóxido causa várias reações na célula: reage com tióis, deesterificando a membrana lipídica e liberando ácido aracdônico, o qual inicia uma cascata metabólica e aumenta a formação do ânion superóxido; depleta NADH celular via reação em cadeia com NADH ligado a lactato desidrogenase; reage com óxido nítrico, produzindo peroxinitrito (um forte oxidante); participa da dismutação do

H₂O₂ e do oxigênio singlet com liberação do íon ferro proveniente da ferritina armazenada (Fridovich, 1986; Hall e Braugher, 1993; Juurlink e Paterson, 1998).

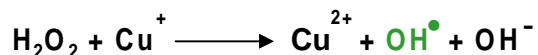
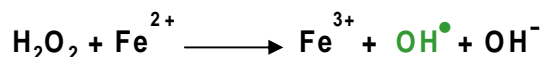
A hipoxantina, um metabólito do ATP via AMP, adenosina e inosina, é convertida à xantina e, após, à ácido úrico pela xantina oxidase, usando NAD⁺ como um aceptor de elétrons. A xantina oxidase usa o O₂ como um aceptor de elétrons, aumentando a produção de íon superóxido e H₂O₂ (Juurlink, 1997; McCord, 1985).

De acordo com Fridovich (1978) e Juurlink e Paterson (1998), o H₂O₂ é gerado a partir do superóxido por meio de dismutação, sendo esta reação catalisada pela superóxido dismutase (SOD).



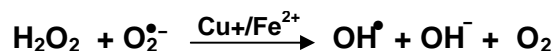
(Dismutação do radical superóxido por ação da superóxido dismutase)

O H₂O₂ também pode ser formado por outros mecanismos, como pelas oxidoredutases nas organelas peroxissomais. Embora sendo relativamente pouco reativo, o H₂O₂ atravessa facilmente as membranas biológicas (Halliwell e Gutteridge, 2007) e, na presença dos íons ferro (Fe²⁺) e cobre (Cu⁺), o mesmo é convertido a radical hidroxila (Reação de Fenton). A partir disto, o ferro oxidado pode ser reduzido pelo ânion superóxido.



(Reação de Fenton)

Os metais de transição podem catalisar a reação entre H₂O₂ e O₂^{•-}, levando à produção de radical hidroxila. Esta reação é conhecida como Reação de Haber-Weiss e é catalisada pelo cobre ou ferro que pode ser proveniente da ferritina, hemoglobina ou mioglobina.



(Reação de Haber-Weiss)

O radical hidroxila é o mais potente oxidante em sistemas biológicos. O OH^\bullet extrai um elétron das enzimas que contêm grupo tiol, como a glutatona redutase e a glutatona peroxidase, DNA e lipídios polinsaturados. Esse radical livre interfere na função mitocondrial, inativando proteínas eletrocarreadoras e ATPase mitocondrial e peroxidando os lipídios de membrana (Juurlink e Paterson, 1998).

O oxigênio *singlet* é formado pela interação entre ânion superóxido-ânion superóxido, peroxinitrito-peróxido de hidrogênio ou ânion superóxido-peróxido de hidrogênio. Ele inativa a cálcio ATPase, desnatura proteínas, inativa a SOD e a catalase, e oxida lipídios polinsaturados produzindo hidroperóxidos e endoperóxidos. Esses peróxidos juntamente com íons de transição podem iniciar a propagação das cadeias de lipoperoxidação ou produzir mais oxigênio *singlet*.

1.4.3 Problemas do encéfalo

Todas as células aeróbicas sofrem dano oxidativo, porém o encéfalo é especialmente suscetível a isso (Halliwell, 1992, 2001). Uma das razões é o seu *alto consumo de O_2* : apesar do encéfalo humano possuir um pequeno percentual no peso corporal, ele é responsável por cerca de 20% do consumo basal de O_2 . A principal razão para o alto consumo de O_2 é a grande quantidade de ATP necessária para manter a homeostase iônica intracelular neuronal.

Além disso, o encéfalo possui outros problemas:

- ✗ *Presença de aminoácidos excitotóxicos*: a concentração de glutamato nos fluidos extracelulares do encéfalo é normalmente baixa ($<1\mu\text{M}$).
- ✗ *Mitocôndria neuronal gera $\text{O}_2^{\bullet-}$* (principalmente a partir do complexo I; Kudin et al., 2005): níveis de 8-hidróxi-2'-deoxiguanosina, mutações e deleções aumentam com a idade no DNA encefálico mitocondrial.
- ✗ *Muitos neurotransmissores são auto-oxidáveis*: dopamina, seu precursor L-DOPA, serotonina e norepinefrina podem reagir com O_2 e gerar, além de $\text{O}_2^{\bullet-}$, quinonas e

semiquinonas que podem depletar glutatona reduzida (GSH) e ligar a grupos SH (Spencer et al., 1998).

- ✘ *Ferro é encontrado em todas as regiões do encéfalo* (Burdo e Connor, 2003; Zecca et al., 2004): importantes proteínas que contém ferro incluem citocromos, ferritina, aconitases, proteínas de ferro não-heme na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, citocromos P450, e hidroxilases de tirosina e triptofano. Várias áreas encefálicas (substância negra, núcleo caudato, putâmen e globo pálido) possuem um alto conteúdo de ferro, que pode ser detectado por ressonância magnética (Schenck e Zimmerman, 2004).
- ✘ *Os lipídios de membrana são ricos em ácidos graxos polinsaturados*: especialmente resíduos de docosa-hexanóico (DHA). Produtos da lipoperoxidação podem lesionar o encéfalo. O 4-hidroxinonenal (HNE) é citotóxico aos neurônios, aumentando os níveis de Ca^{2+} , inativando os transportadores de glutamato e prejudicando as proteínas dos neurofilamentos (Mark et al., 1997; Ong et al., 2000).
- ✘ *O metabolismo encefálico produz uma grande quantidade de H_2O_2* : não somente via SODs, mas também via enzimas monoamina oxidases A e B que estão localizadas no lado de fora da membrana mitocondrial dos neurônios e glia. Elas catalizam a reação monoamina (RCH_2NH_2) + O_2 + H_2O \longrightarrow aldeído (RCHO) + H_2O_2 + NH_3 e produzem H_2O_2 no encéfalo (Gal et al., 2005).
- ✘ *As defesas antioxidantes são modestas*: em particular, os níveis de catalase são baixos na maioria das regiões do encéfalo (no hipotálamo e na substância negra são um pouco maiores do que no córtex e no cerebelo; Halliwell, 2001).
- ✘ *ER podem contribuir para a “abertura” da barreira hematoencefálica*: permitindo a entrada de neurotoxinas, endotoxinas e células inflamatórias no encéfalo (Krizbai et al., 2005; Kim et al., 2003; Savaraj et al., 2005).

× *A hemoglobina é neurotóxica*: essa proteína é normalmente transportada de forma segura pelos eritrócitos que, por sua vez, são ricos em enzimas antioxidantes. Entretanto, hemoglobina isolada é degradada em exposição ao excesso de H_2O_2 , liberando íons ferro pró-oxidantes do anel heme (Gutteridge, 1986). Além disso, a hemoglobina reage com o H_2O_2 e outros peróxidos para formar espécies oxidáveis (radicais heme ferril e de vários aminoácidos) capazes de estimular a lipoperoxidação.

1.4.4 Marcadores do estresse oxidativo

Os radicais livres podem atacar uma série de biomoléculas, iniciando reações em cascata onde um radical reage com um composto gerando novos radicais. O alvo celular dos radicais (proteínas, lipídios e DNA) está relacionado ao seu sítio de formação.

1.4.4.1 Lipídios

Todas as membranas celulares são vulneráveis à oxidação devido às suas altas concentrações de ácidos graxos insaturados. O dano a lipídios, conhecido como lipoperoxidação (LPO), acarreta alterações na fluidez e na permeabilidade das membranas. Conseqüentemente, ocorre perda da seletividade na troca iônica, inativação de receptores e liberação do conteúdo das organelas, como as enzimas hidrolíticas lisossomais, e formação de produtos citotóxicos como o malondialdeído (MDA) e o HNE, culminando em perda da homeostasia e morte celular (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A LPO é uma reação em cadeia e ocorre em 3 etapas: iniciação, propagação e terminação (Fig. 3).

1. *Iniciação*: envolve o seqüestro de um átomo de hidrogênio do grupo metileno do lipídio (LH). Tal seqüestro pode ser realizado pelo OH^\bullet , com conseqüente formação do radical lipídico (L^\bullet).

2. *Propagação*: na primeira reação, o L^\bullet reage rapidamente com o O_2 , resultando em radical peroxila (LOO^\bullet), que por sua vez seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo polinsaturado, formando novamente o L^\bullet na segunda reação.
3. *Terminação*: os radicais L^\bullet e LOO^\bullet reagem entre si formando compostos não radicalares.

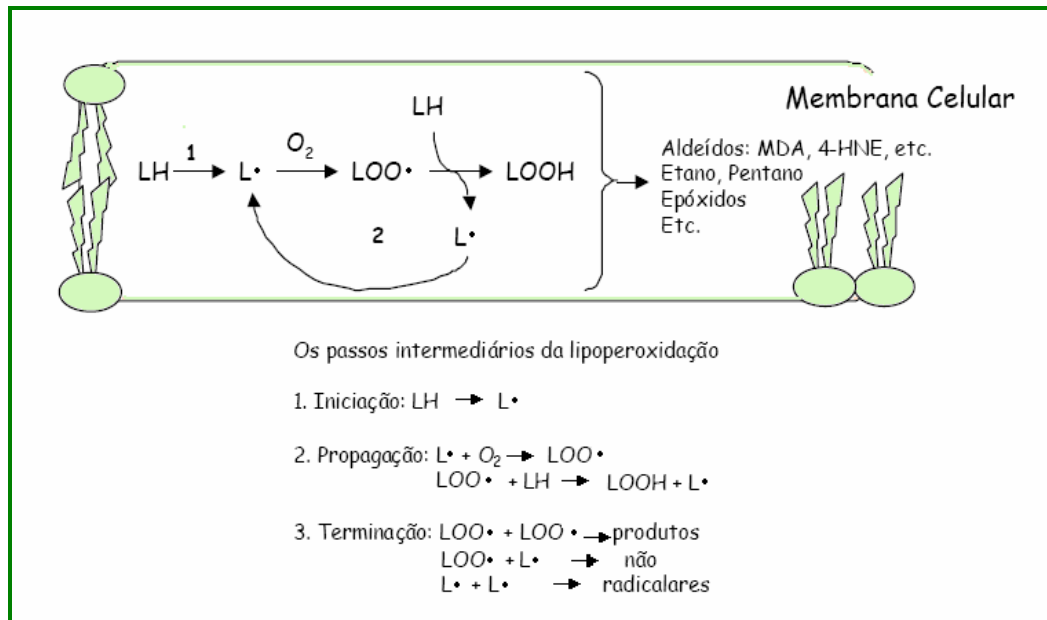


Figura 3: Etapas da lipoperoxidação (fonte: Carvalho et al., 2003).

A peroxidação lipídica pode ser estimada pela medida de seus produtos, sendo freqüentemente utilizada para medir indiretamente a produção de radicais livres (Punchard e Kelly, 1996). Atualmente, vários estudos têm utilizado a técnica de TBARS como medida indireta de LPO (Figuera et al., 2003; Malfatti et al., 2003; Ribeiro et al., 2005). Segundo Brown e Kelly (1996), essa técnica mede a peroxidação de lipídios pela reação do ácido tiobarbitúrico com o MDA, que é um biomarcador de estresse oxidativo e é um dos últimos produtos liberados na LPO.

1.4.4.2 Proteínas

As proteínas, importantes constituintes das membranas, podem ser alvo de ataque das ERO. Em concentrações fisiológicas, o H_2O_2 e o radical superóxido exercem efeitos leves nas proteínas; entretanto, aquelas que contêm grupos SH podem sofrer oxidação quando interagem com H_2O_2 . As proteínas podem sofrer dano direto ou indireto a partir da interação com ERO, incluindo peroxidação, prejuízo a resíduos de aminoácidos específicos, mudanças na sua estrutura terciária, degradação e fragmentação. As conseqüências do dano protéico, como um mecanismo de resposta ao estresse, são perda da atividade enzimática, alteração de funções celulares como a produção de energia, interferência na criação de potenciais de membrana e mudanças no tipo e no nível protéico celular.

Os produtos da oxidação protéica são usualmente aldeídos, ceto compostos e carbonilas (Kohen e Nyska, 2002). Particularmente, os aminoácidos histidina, arginina e lisina são os principais alvos das ERO para a produção de grupos carbonil ($>C=O$). O conteúdo dos grupos carbonil nas proteínas pode ser medido através da reação desse grupo com 2,4 - dinitrofenil-hidrazina (Praticò e Delanty, 2000) para formar 2,4 -dinitrofenil-hidrazona, que pode ser detectada e quantificada espectrofotometricamente ou imunoquimicamente (Levine et al., 2002). O conteúdo de grupos carbonil está aumentado na neurodegeneração relacionada à idade (Stadtman, 2001), em modelos experimentais de doenças neurodegenerativas, como nas doenças de Alzheimer (Aksenov et al., 2001), Huntington (Tunez et al., 2004) e Parkinson (Butterfield e Kanski, 2001); bem como em modelos de convulsões induzidos por pentilenotetrazol (Schneider Oliveira et al., 2004).

1.4.4.3 DNA

Apesar do DNA ser uma molécula estável e bem protegida, as ERO podem interagir com o mesmo e causar vários tipos de dano: modificação das bases do DNA, quebra simples e dupla do DNA, perda das purinas, dano ao açúcar deoxirribose e dano ao sistema de reparo do

DNA. A ERO que mais causa dano ao DNA é o radical hidroxila. A interação direta do DNA com outras ERO menos reativas, como o $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , não causam dano em concentrações fisiológicas. No entanto, essas espécies reativas servem como fonte para outros intermediários reativos que podem facilmente atacar e causar dano.

1.4.5 Sistemas de defesa antioxidantes

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou as células a desenvolverem mecanismos de defesa que controlassem os níveis de ER e impedissem a indução de danos, os antioxidantes. O sistema de defesa inclui antioxidantes enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT); antioxidantes não enzimáticos, como o ácido ascórbico, tocoferol, glutatona e carotenóides; proteínas extracelulares ligantes de ferro e cobre, como a albumina, transferrina, ferritina e ceruloplasmina; e antioxidantes exógenos polifenólicos como os flavonóides.

1.4.5.1 Defendendo o encéfalo

Uma importante estratégia para proteger o encéfalo das ERO é manter os níveis de O_2 baixos o suficiente para manter apenas a demanda metabólica. Pequenas quantidades de O_2 reduzem as reações de auto-oxidação, a produção de $O_2^{\bullet-}$ e a atividade das oxidases.

1.4.5.1.1 Defesas enzimáticas

× SOD

Todas as regiões do sistema nervoso contém SODs, enzimas que removem $O_2^{\bullet-}$ catalisando a sua dismutação, um $O_2^{\bullet-}$ sendo reduzido a H_2O_2 e outro oxidado a O_2 (Fridovich 1989, 1995; Halliwell, 2001; Liochev e Fridovich, 2005).



A isoforma da SOD presente na matriz mitocondrial é dependente de manganês (MnSOD), enquanto as isoformas encontradas no espaço intermembrana mitocondrial e no

citosol são dependentes de cobre e zinco (CuZnSOD; Fridovich, 1995). A SOD pode ter um efeito pró-oxidante, visto que uma atividade elevada, sem aumento compensatório das enzimas CAT e/ou GSH-Px, promoveria um excesso de H₂O₂ que poderia reagir com outro O₂ e formar o poderoso radical OH[•].

× **CAT**

A CAT, que catalisa a redução de 2H₂O₂ a 2H₂O e O₂, é uma enzima composta de quatro subunidades (cada uma contendo um grupamento heme), está presente em todos os tipos de células de mamíferos e está localizada, principalmente, nos peroxissomas. Como não está presente na mitocôndria, onde grande quantidade de O₂^{•-} é formado, não é muito importante para o encéfalo (Turrens, 2003).



A atividade da CAT pode ser inibida pela ação do superóxido. Essa inibição recíproca pelo substrato de uma enzima sobre a outra funciona como um mecanismo regulatório para que haja uma atividade acoplada entre elas (Kono e Fridovich, 1982).

× **GSH-Px**

A GSH-Px é a principal enzima que remove H₂O₂ tanto no cérebro quanto em outros tecidos animais. Apresenta, em sua estrutura, quatro unidades protéicas, cada uma contendo um átomo de selênio (Se). Existem pelo menos quatro tipos de GSH-Px nos mamíferos, sendo que todos eles podem catalisar a redução de H₂O₂ em H₂O utilizando glutathiona reduzida (GSH) como substrato. Além disso, a GSH-Px também reduz outros peróxidos orgânicos (ROOH) em álcool.



1.5 ESTRESSE OXIDATIVO E ERROS INATOS DO METABOLISMO

O estresse oxidativo está envolvido nos mecanismos patológicos de várias doenças neurodegenerativas, tais como Parkinson, Alzheimer, Huntington e Esclerose Lateral Amiotrófica (Delanty e Dichter, 1998; Matés, Pérez-Gómez e Castro 1999; Halliwell e Gutteridge, 2007), bem como em alguns EIM intermediário (Wajner et al., 2004). A formação de radicais livres e de espécies reativas está presente nas acidemias propiônica e metilmalônica (Fontella et al., 2000; Pettenuzzo et al., 2003), na acidemia glutárica (Latini et al. 2003), na tirosinemia tipo I (Bird et al., 1995), na doença do xarope do bordo (Barschak et al., 2006; Bridi et al., 2003, 2005) e na hiperprolinemia (Delwing et al., 2003).

Existem evidências da participação do estresse oxidativo na apoptose encontrada em várias doenças renais (Xie e Guo, 2006). No caso da cistinose, isso também parece ocorrer. Porém, a co-administração de cisteamina, droga utilizada no tratamento dessa doença, previne, pelo menos em parte, as possíveis alterações do estado oxidativo encontrado em rins de ratos submetidos a modelo experimental de cistinose (Rech et al., 2007). Essas observações sugerem que a cisteamina também possa interferir no estado oxidativo de outros órgãos e tecidos acometidos por essa doença.

PARTE II

II. OBJETIVOS

Considerando que a cisteamina, droga de escolha no tratamento da cistinose, (1) é um potente aminotiol redutor, (2) que compostos tiólicos possuem um importante papel na proteção contra lesões oxidativas e (3) que o estresse oxidativo está envolvido em várias desordens neurodegenerativas, é possível que essa droga possa prevenir os efeitos tóxicos e oxidantes do dissulfeto cistina.

Assim sendo, o presente estudo teve como objetivos:

- ✘ Investigar os efeitos da administração aguda de cisteamina sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens, bem como os efeitos *in vitro* da CSH nos mesmos parâmetros de estresse oxidativo em córtex de ratos não tratados.

- ✘ Verificar os efeitos da co-administração de cisteamina sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos submetidos à administração crônica do pró-oxidante éster de dimetil cistina.

III. MÉTODO E RESULTADOS

III.1 CAPÍTULO I

Effects of cysteamine on oxidative status in cerebral cortex of rats

Adriana Kessler, Micheli Biasibetti, Luciane Rosa Feksa, Virginia Cielo Rech, Denizar Alberto da Silva Melo, Moacir Wajner, Carlos Severo Dutra-Filho, Ângela Terezinha de Souza Wyse, Clovis Milton Duval Wannmacher

Metabolic Brain Disease

DOI 10.1007/s11011-007-9078-x

III.2 CAPÍTULO II

Antioxidant effect of cysteamine in brain cortex of young rats

Adriana Kessler, Micheli Biasibetti, Denizar Alberto da Silva Melo, Moacir Wajner, Carlos

Severo Dutra-Filho, Ângela Terezinha de Souza Wyse,

Clovis Milton Duval Wannmacher

Neurochemical Research

DOI 10.1007/s11064-007-9486-7

PARTE III

IV. DISCUSSÃO

A cistinose é uma doença metabólica, autossômica recessiva, caracterizada por um defeito no transporte de cistina para fora dos lisossomos, levando a um acúmulo intracelular desse dissulfeto (Gahl et al., 2001). A ausência ou deficiência do transportador de cistina leva à formação de cristais de cistina em vários tecidos, incluindo os rins e o sistema nervoso. O tratamento específico para a cistinose é a terapia oral com CSH, um aminotiol que reduz drasticamente os níveis intracelulares de cistina. Quando indicada precocemente e em altas doses, a CSH retarda a deterioração glomerular, melhora o crescimento linear, previne o hipotireoidismo, diminui o conteúdo de cistina muscular e o envolvimento do sistema nervoso central (Gahl, 2003).

Nas últimas décadas, a sobrecarga de lisossomos por éster de dimetil cistina (CDME), um análogo da cistina, tem sido utilizada para o estudo da patogênese da cistinose (Foreman et al., 1987). Células cistinóticas, assim como células normais com sobrecarga de CDME, são mais suscetíveis à apoptose, mesmo com capacidade mitocondrial geradora de energia normal (Park et al., 2002). Além disso, a cistina aumenta a resposta citotóxica de bactérias ao H_2O_2 , possivelmente por meio de uma troca entre grupos tiólicos e dissulfetos na membrana celular (Cantoni et al., 1995). Foi observado um aumento da relação GSSG/GSH (%) em células de pacientes cistinóticos, sugerindo um aumento de estresse oxidativo (Levtchenko et al., 2005; Laube et al., 2006). É possível que, diante de situações de grande demanda de energia ou de estresse oxidativo, as células cistinóticas apresentem depleção de GSH (Wilmer et al., 2005; Levtchenko et al., 2005; Mannucci et al., 2006).

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que a cistina inibe a atividade de importantes enzimas tiólicas como a creatinaquinase (CK; Fleck et al., 2005) e a piruvatoquinase (PK; Feksa et al., 2004) em córtex cerebral, provavelmente pela oxidação dos

grupos tiólicos das enzimas. Quando foi utilizada sobrecarga lisossomal cortical cerebral por administração de CDME, ocorreu redução na relação tióis/dissulfetos e nas atividades da CK e da PK. A co-administração de CSH preveniu esses efeitos (Rech et al., 2008).

O encéfalo possui um alto consumo de O₂, altas concentrações de ferro, níveis relativamente baixos de enzimas antioxidantes, conteúdo lipídico relativamente alto com grande quantidade de ácidos graxos insaturados e catecolaminas, tornando-se vulnerável ao estresse oxidativo. Sendo assim, o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia de várias doenças que comprometem o sistema nervoso central, incluindo alguns EIM.

Sabendo que a CSH, droga utilizada para depletar cistina lisossomal, é um aminotiol, que compostos tiólicos auxiliam na proteção contra danos oxidativos, que a cistina possui efeitos tóxicos e oxidativos, que alguns pacientes cistinóticos podem apresentar comprometimento do sistema nervoso central e que o encéfalo é suscetível ao estresse oxidativo, foi proposta a hipótese de que, além de retirar a cistina dos lisossomos, a CSH possa interferir no estado oxidativo cerebral.

Primeiramente, na tentativa de contribuir para o esclarecimento dessa hipótese, avaliamos os efeitos *in vitro* e da administração aguda de CSH sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens (capítulo I). Nos experimentos *in vitro*, a CSH reduziu a lipoperoxidação, a carbonilação protéica, os níveis de radicais livres (DCFH) e a atividade da CAT. No entanto, a atividade da GSH-Px aumentou e da SOD não sofreu alteração. É possível que a inibição da CAT na concentração de 1 mM seja uma consequência da reação entre os grupos tiólicos da CSH e da enzima. Nesse caso, o acúmulo do H₂O₂ estimulou a atividade da GSH-Px. A administração aguda de CSH também reduziu a lipoperoxidação, porém aumentou a carbonilação protéica e manteve os níveis de radicais livres. Esses resultados sugerem que a CSH preveniu a LPO, agindo como um sequestrador de radicais superóxido, e induziu a carbonilação protéica possivelmente por acúmulo de

cistamina, um dissulfeto oxidante formado na reação entre CSH e radicais superóxido. Em relação às atividades enzimáticas, a administração aguda de CSH reduziu a atividade da GSH-Px, entretanto estimulou a CAT e não interferiu na SOD. O aumento da atividade da CAT pode ter ocorrido por um efeito rebote, visto que a CSH, um inibidor da atividade da enzima, não estava mais presente ou então, por seqüestro de radicais superóxido que também inibem a CAT. Portanto, a redução da atividade da GSH-Px pode ser devida à diminuição dos níveis de H_2O_2 pelo aumento da atividade da CAT. Os resultados desta etapa do estudo sugerem que a CSH tenha agido como seqüestradora de ânions superóxido, diminuindo a formação de H_2O_2 e ânions hidroxila.

A partir dessas observações, o próximo passo de nossa investigação foi verificar os efeitos da co-administração de CSH sobre os mesmos parâmetros de estresse oxidativo estudados anteriormente em córtex cerebral de ratos submetidos à um modelo experimental de cistinose por administração crônica de CDME (capítulo II). Verificamos que o CDME induziu a oxidação do DCFH, a LPO e a carbonilação protéica e estimulou a atividade das enzimas CAT, SOD e GSH-Px, possivelmente por formação de ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. Também observamos que o CDME diminuiu a relação tióis/dissulfetos. Por sua vez, a co-administração de CSH restabeleceu o equilíbrio redox e preveniu o estresse oxidativo induzido pelo CDME, provavelmente pelo aumento de grupos tiólicos celulares e pelo seqüestro de radicais livres.

Compostos tiólicos, como a CSH, são alvos fisiológicos para radicais superóxido e H_2O_2 , sendo mais reativos quando totalmente ionizados. A retirada de superóxido pode ocorrer por oxidação de compostos tiólicos e pode depletar defesas contra outros oxidantes ou alterar o balanço redox para um estado mais oxidado (Winterbourn e Metodiewa, 1999). A alteração do equilíbrio redox pode ser nocivo porque o potencial redox intracelular pode determinar se uma substância pode agir como antioxidante ou pró-oxidante (Rosenberg et al.,

1999). Por outro lado, a atividade tiol oxidase da Cu, Zn-SOD pode levar à oxidação de tióis com conseqüente formação de H_2O_2 (Winterbourn et al., 2002).

Os principais sistemas celulares tiol/dissulfeto, GSH/GSSG e cisteína/cistina não estão em equilíbrio redox e respondem individualmente aos estímulos fisiológicos e a substâncias tóxicas (Jones, 2006). Variações do sistema redox cisteína/cistina acima dos valores normais afetam vias de sinalização que controlam a proliferação celular e a apoptose induzida por oxidantes (Jones, 2006a). Os resultados apontam para a conclusão de que antioxidantes que seqüestram radicais livres têm grande importância quando o estado redox tiol/dissulfeto está oxidado. Assim, a administração de CDME, um dissulfeto, pode alterar o estado redox tiol/dissulfeto e a co-administração de CSH, um tiol, pode restabelecer esse estado redox. Portanto, o estado redox tiol/dissulfeto, *per se*, funciona na sinalização redox e controla tanto quanto a proteção antioxidante (Jones, 2006).

O estresse oxidativo tem sido associado com apoptose em diversas doenças (Corcoran et al., 1994). O próprio sistema redox cisteína/cistina pode oxidar proteínas sem o envolvimento direto de outros oxidantes mais potentes (Jones et al., 2004). O HNE, um produto da LPO, ativa o estresse oxidativo ligado à morte celular por apoptose através da ativação da cascata da caspase (Liu et al., 2000). A CSH quando seqüestra HNE (Dominy et al., 2007) pode bloquear essa causa da apoptose. O evento oxidativo que ativa a indução da apoptose por H_2O_2 é a reação de Fenton que, por sua vez, é dependente do estado tiol ou selênio da célula (Antunes e Cadenas, 2001).

A permeabilização da membrana mitocondrial (PMM) parece ser indispensável para a morte celular iniciada ao nível dos lisossomos, indicando que a PMM exerce um papel central na cascata de sinalização que leva à morte celular (Boya et al., 2003). A permeabilização da membrana lisossomal durante as fases iniciais da apoptose foi sugerida como forma de liberação da cistina acumulada, a qual exerceria sua ação nos outros compartimentos

celulares, principalmente por cisteinilação de proteínas (Park et al., 2006). Atualmente há uma tendência crescente a aceitar a hipótese de que a cistina necessita sair dos lisossomos para desencadear o processo de morte celular, pois existem evidências de que o acúmulo de cistina nos lisossomos não altera o estado oxidativo da célula.

V. CONCLUSÕES

Objetivo 1 - Investigar os efeitos da administração aguda de cisteamina sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens, bem como os efeitos in vitro da CSH nos mesmos parâmetros de estresse oxidativo em córtex de ratos não tratados.

Conclusões

1. A administração aguda de CSH preveniu a LPO, sugerindo que a CSH agiu como um seqüestrador de radicais superóxido, porém induziu a carbonilação protéica, possivelmente por acúmulo de cistamina formada pela reação entre CSH e radicais superóxido.
2. A administração aguda de CSH estimulou a atividade da CAT, provavelmente por reação de defesa, e reduziu a atividade da GSH-Px, possivelmente pela diminuição dos níveis de H_2O_2 promovida pelo aumento da atividade da CAT.
3. In vitro, a CSH reduziu a LPO, a carbonilação protéica e os níveis de radicais livres (oxidação da DCFH), sugerindo que a droga possua efeito antioxidante.
4. In vitro, a CSH reduziu a atividade da CAT, por uma possível reação entre os grupos tiólicos da CSH e da enzima, e estimulou a atividade da GSH-Px pelo acúmulo de H_2O_2 causado pela diminuição da atividade da CAT.

Objetivo 2 - Verificar os efeitos da co-administração de cisteamina sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos submetidos à administração crônica do pró-oxidante éster de dimetil cistina.

Conclusões

- 1- A administração crônica do CDME aumentou a formação de radicais livres (oxidação da DCFH), as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e a carbonilação de proteínas, sugerindo a formação de peróxido de hidrogênio, ânions superóxido e radicais hidroxila.
- 2- As atividades das enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GSH-Px) aumentaram no córtex cerebral de ratos após a última administração do CDME, possivelmente por formação de peróxido de hidrogênio, ânions superóxido e radicais hidroxila.
- 3- A relação tióis/dissulfetos diminuiu no córtex cerebral dos ratos que receberam a administração de CDME.
- 4- A co-administração de CSH aumentou a relação tióis/dissulfetos e preveniu os efeitos do CDME sobre os parâmetros de estresse oxidativo estudados, sugerindo que este aminotiol possa agir como um sequestrador de radicais livres, especialmente ânions superóxido e radicais hidroxila.

Conclusão geral

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que, na forma de CDME, a cistina se acumula nos lisossomos e induz a formação de radicais livres e que a CSH, droga de escolha no tratamento da cistinose, previne os efeitos dos radicais livres formados. Portanto, a CSH, além de ser uma droga depletora de cistina intralisossomal, pode ser benéfica também pelo seu efeito antioxidante, reduzindo o dano celular por apoptose. Entretanto, considerando as limitações do modelo experimental de cistinose por sobrecarga de CDME, outros estudos são necessários para avaliar o estresse oxidativo em pacientes cistinóticos antes e após o tratamento com CSH.

VI. PERSPECTIVAS

Considerando os resultados, abriu-se a perspectiva da continuação deste estudo com os seguintes objetivos:

- ✦ Avaliar os parâmetros de estresse oxidativo em leucócitos e soro de pacientes afetados por cistinose submetidos e não submetidos ao tratamento com cisteamina.

- ✦ Investigar os efeitos da administração aguda e crônica de CDME e/ou CSH sobre tarefas comportamentais de aprendizado e memória em ratos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aksenov MY, Aksenova MV, Butterfield DA, Geddes JW, Markesbery WR. Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2001;103(2):373-83.
- Antunes F, Cadenas E. Cellular titration of apoptosis with steady state concentrations of H₂O₂: submicromolar levels of H₂O₂ induce apoptosis through Fenton chemistry independent of the cellular thiol state. *Free Radic Biol Med*. 2001;30:1008-18.
- Barschak AG, Sitta A, Deon M, Oliveira MH, Haeser A, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis*. 2006;21(4):279-86.
- Ben-Nun A, Bashan N, Potashnik R, Cohen-Luria R, Moran A. Cystine loading induces Fanconi's syndrome in rats: in vivo and vesicle studies. *Am J Physiol*. 1993; 265: 839-44.
- Benson PF, Fenson AH. *Genetic Biochemical Disorders*. Oxford: Oxford 692, University Press, p.692,1985.
- Bickel H. Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. *Enzyme*. 1987;38(1-4):14-26.
- Bird S, Miller NJ, Collins JE, Rice-Evans A. Plasma antioxidant capacity in two cases of tirosinaemia type 1: one case treated with NTBC. *J Inherit Metab Dis*. 1995;18:123-6.
- Boya P, Andreau K, Poncet D, Zamzami N, Perfettini JL, Metivier D, Ojcius DM, Jaattela M, Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. *J Exp Med*. 2003;197:1323-34.
- Bridi R, Araldi J, Sgarbi MB, Testa CG, Durigon K, Wajner M, Dutra-Filho CS. Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Int J Dev Neurosci*. 2003; 21(6):327-332.
- Bridi R, Braun CA, Zorzi GK, Wannmacher CM, Wajner M, Lissi EG, Dutra-Filho CS. Alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease stimulate lipid peroxidation and reduce antioxidant defences in cerebral cortex from young rats. *Metab Brain Dis*. 2005; 20(2):155-167.

- Brown RK, Kelly FJ. Peroxides and other products. In: PUNCHARD, NA and Kelly FJ (eds). Free radicals: a practical approach. New York: Oxford, University Press; 1996, p.119-131.
- Bulfield G. Inherited metabolic disease in laboratory animals: a review. *J Inherit Metab Dis.* 1980;3(4):133-43.
- Burdo JR, Connor JR. Brain iron uptake and homeostatic mechanisms: an overview. *Biometals.* 2003;16(1):63-75.
- Burton NR, Smith DA, Stone TW. A quantitative pharmacological analysis of some excitatory amino acid receptors in the mouse neocortex in vitro. *Br J Pharmacol.* 1988 Mar;93(3):693-701.
- Butterfield DA, Kanski J. Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins. *Mech Ageing Dev.* 2001;122(9):945-62.
- Cantoni O, Brandi G, Albano A, Cattabeni F. Action of cystine in the cytotoxic response of *Escherichia coli* cells exposed to hydrogen peroxide. *Free Radic Res.* 1995;22:275-83.
- Carvalho HF, Recco-Pimentel SM. *A Célula.* 2ª ed. São Paulo: Editora Manole; 2007.
- Carvalho, AZ, Bianco, AAG, Beton D, Tejada, ECS, da Silva, FHL Ribichich, KF, Rodrigues, LO, Miyamoto, S, Koide, T, Bayardo, BT (org). *Nutrição e Esporte-Uma abordagem bioquímica.* Instituto de Química – Departamento de Bioquímica. USP (retirado da Internet), último acesso dia 01/07/2007 em <http://sbbq.iq.usp.br/revista/mtdidaticos/esportes.pdf>
- Chavko M, Auker CR, McCarron RM. Relationship between protein nitration and oxidation and development of hyperoxic seizures. *Nitric Oxide.* 2003 Aug;9(1):18-23.
- Cooper GM. *A célula uma abordagem molecular.* 2ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed; 2005.
- Corcoran GB, Fix L, Jones DP, Moslen MT, Nicotera P, Oberhammer FA, Buttyan R. Apoptosis: molecular control point in toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1994;128:169-78.
- Delanty N, Dichter MA. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol Scand.* 1998;98:145-53.
- Delwing D, Bavaresco CS, Wannmacher CM, Wajner M, Dutra-Filho CS, Wyse AT. Proline induces oxidative stress in cerebral cortex of rats. *Int Dev Neurosci.* 2003;21(2):105-10.

Dominy JE, Simmons CR, Hirschberger LL, Hwang J, Coloso RM, Stipanuk MH. Discovery and characterization of a second mammalian thiol dioxygenase, cysteamine dioxygenase. *J Biol Chem.* 2007;282(35):25189-98.

Feksa LR, Cornelio A, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM. Inhibition of pyruvate kinase activity by cystine in brain cortex of rats. *Brain Res.* 2004;1012(1-2):93-100.

Figuera MR, Queiroz CM, Stracke MP, Brauer MC, González-Rodríguez LL, Frussa-Filho R, Wajner M, de Mello CF. Ascorbic acid and alpha-tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsions. *Neuroreport.* 1999;10(10):2039-43.

Fleck RM, Rodrigues Junior V, Giacomazzi J, Parissoto D, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM. Cysteamine prevents and reverses the inhibition of creatine kinase activity caused by cystine in rat brain cortex. *Neurochem Int.* 2005;46(5):391-7.

Fontella FU, Pulronik V, Gasse E, Wannmacher CM, Klein AB, Wajner M, Dutra-Filho CS. Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. *Neuroreport.* 2000;11(3):541-4.

Foreman JW, Bowring MA, Lee J, States B, Segal S. Effect of cystine dimethyl ester on renal solute handling and isolated renal tubule transport in the rat. A new model of the Fanconi syndrome. *Metab.* 1987; 36:1185-1191.

Fridovich I. Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys.* 1986 May 15;247(1):1-11.

Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem.* 1989;264(14):7761-4.

Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:97-112.

Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science.* 1978;201(4359):875-80.

Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA. Cystinosis. *N Engl J Med.* 2002;347(2):111-21.

Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA. Cystinosis: a disorder of lysosomal membrane transport. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* 8th ed. New York: McGraw Hill; 2001, p. 5085-108.

Gahl WA. Early oral cysteamine therapy for nephropathic cystinosis. *Eur J Pediatr.* 2003 Dec;162 Suppl 1:S38-41.

Gal S, Zheng H, Fridkin M, Youdim MB. Novel multifunctional neuroprotective iron chelator-monoamine oxidase inhibitor drugs for neurodegenerative diseases. In vivo selective brain monoamine oxidase inhibition and prevention of MPTP-induced striatal dopamine depletion. *J Neurochem.* 2005;95(1):79-88.

Gutteridge JM. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Lett.* 1986;201(2):291-5.

Hall ED, Braughler JM. Free radicals in CNS injury. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis.* 1993;71:81-105.

Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.* 1994 Dec;102 Suppl 10:5-12.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* 4th ed. New York: Oxford University Press Inc; 2007.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004 May;142(2):231-55.

Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 2006 Jun;97(6):1634-58.

Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem.* 1992;59(5):1609-23.

Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006 Jun;141(2):312-22

Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging.* 2001;18(9):685-716.

Herschkowitz N. Brain development in the fetus, neonate and infant. *Biol Neonate.* 1988;54(1):1-19.

Hirota Y, Masuyama N, Kuronita T, Fujita H, Himeno M, Tanaka Y. Analysis of post-lysosomal compartments. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Feb 6;314(2):306-12.

Jones DP, Go YM, Anderson CL, Ziegler TR, Kinkade JrJM, Kirilin WG. Cysteine/cystine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologic redox signaling and control. *FASEB J.* 2004;18:1246-8.

Jones DP. Extracellular redox state: refining the definition of oxidative stress in aging. *Rejuvenation Res.* 2006;9:169-81.

Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 2006;8:1865-79.

Juurlink BH, Paterson PG. Review of oxidative stress in brain and spinal cord injury: suggestions for pharmacological and nutritional management strategies. *J Spinal Cord Med.* 1998;21(4):309-34.

Juurlink BH. Response of glial cells to ischemia: roles of reactive oxygen species and glutathione. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997 Mar;21(2):151-66.

Kalatzis V, Antignac C. New aspects of the pathogenesis of cystinosis. *Pediatr Nephrol.* 2003 Mar;18(3):207-15.

Kleta R, Gahl WA. Pharmacological treatment of nephropathic cystinosis with cysteamine. *Expert Opin Pharmacother.* 2004 Nov;5(11):2255-62.

Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002 Nov-Dec;30(6):620-50.

Kono Y, Fridovich I. Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem.* 1982; 257(10):5751-4.

Kooistra T, Millard PC, Lloyd JB. Role of thiols in degradation of proteins by cathepsins. *Biochem J.* 1982 May 15;204(2):471-7.

Krizbai IA, Bauer H, Bresgen N, Eckl PM, Farkas A, Szatmári E, Traweger A, Wejksza K, Bauer HC. Effect of oxidative stress on the junctional proteins of cultured cerebral endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol.* 2005;25(1):129-39.

Kudin AP, Debska-Vielhaber G, Kunz WS. Characterization of superoxide production sites in isolated rat brain and skeletal muscle mitochondria. *Biomed Pharmacother.* 2005;59(4):163-8.

Latini A, Scussiato K, Borba Rosa R, Leipnitz G, Llesuy S, Belló-Klein A, Dutra-Filho CS, Wajner M. Induction of oxidative stress by L-2 hydroxyglutaric acid in rat brain. *J Neurosci Res.* 2003;74:103-10.

Laube GF, Shah V, Stewart VC, Hargreaves IP, Haq MR, Heales SJ, van't Hoff WG. Glutathione depletion and increased apoptosis rate in human cystinotic proximal tubular cells. *Pediatr Nephrol.* 2006;21: 503-9.

- Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med.* 2002;32(9):790-6.
- Levtchenko E, Graaf-Hess A, Wilmer AM, van der Heuvel L, Monnens L, Blom H. Altered status of glutathione and its metabolites in cystinotic cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20:1828-32.
- Liochev SI, Fridovich I. Cross-compartment protection by SOD1. *Free Radic Biol Med.* 2005;38(1):146-7.
- Liu W, Kato M, Akhand AA, Hayakawa A, Suzuki H, Miyata T, Kurokawa K, Hotta Y, Ishikawa N, Nakashima I. 4-hydroxynonenal induces a cellular redox status-related activation of the caspase cascade for apoptotic cell death. *J Cell Sci.* 2000;113:635-41.
- Malfatti CR, Royes LF, Francescato L, Sanabria ER, Rubin MA, Cavalleiro EA, Mello CF. Intrastratial methylmalonic acid administration induces convulsions and TBARS production, and alters Na⁺,K⁺-ATPase activity in the rat striatum and cerebral cortex. *Epilepsia.* 2003;44(6):761-7.
- Mannucci L, Pastore A, Rizzo C, Piemonte F, Rizzoni G, Emma F. Impaired activity of the gamma-glutamyl cycle in nephropathic cystinosis fibroblasts. *Pediatr Res.* 2006;59: 332-5.
- Mark RJ, Lovell MA, Markesbery WR, Uchida K, Mattson MP. A role for 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid beta-peptide. *J Neurochem.* 1997;68(1):255-64.
- Matés JM, Pérez-Gómez, Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999;32:595-603.
- Maunsbach AB. Cellular mechanisms of tubular protein transport. *Int Rev Physiol.* 1976;11:145-67.
- McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 1985;312(3):159-63.
- Meneghini, R. *Ciência Hoje.* 1987;(5)28:57-62.
- Ong WY, Lu XR, Hu CY, Halliwell B. Distribution of hydroxynonenal-modified proteins in the kainate-lesioned rat hippocampus: evidence that hydroxynonenal formation precedes neuronal cell death. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(8):1214-21.

- Park M, Helip-Wooley A, Thoene J. Lysosomal cystine storage augments apoptosis in cultured human fibroblasts and renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(12):2878-87.
- Park MA, Pejovic V, Kerisit KG, Junius S, Thoene JG. Increased apoptosis in cystinotic fibroblasts and renal proximal tubule epithelial cells results from cysteinylolation of protein kinase C (delta). *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:3167-75.
- Pettenuzzo LF, Schuck PF, Wyse AT, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Netto CA, Wajner M. Ascorbic acid prevents water maze behavioral deficits caused by early post natal methylmalonic acid administration in the rat. *Brain Res.* 2003;976(2):234-42.
- Pisoni RL, Acker TL, Lisowski KM, Lemons RM, Thoene JG. A cysteine-specific lysosomal transport system provides a major route for the delivery of thiol to human fibroblast lysosomes: possible role in supporting lysosomal proteolysis. *J Cell Biol.* 1990 Feb;110(2):327-35.
- Pisoni RL, Park GY, Velilla VQ, Thoene JG. Detection and characterization of a transport system mediating cysteamine entry into human fibroblast lysosomes. Specificity for aminoethylthiol and aminoethylsulfide derivatives. *J Biol Chem.* 1995 Jan 20;270(3):1179-84.
- Praticò D, Delanty N. Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. *Am J Med.* 2000;109(7):577-85.
- Punchard NA, Kelly FJ. *Free radicals: a practical approach.* New York: Oxford University Press; 1996.
- Rech VC, Feksa LR, Arevalo do Amaral MF, Koch GW, Wajner M, Wyse AT, Wannmacher CM. Promotion of oxidative stress in kidney of rats loaded with cystine dimethyl ester. *Pediatr Nephrol.* 2007;22(8):1121-8.
- Rech VC, Feksa LR, Fleck RM, Athaydes GA, Dornelles PK, Rodrigues-Junior V, Wannmacher CM. Cysteamine prevents inhibition of thiol-containing enzymes caused by cystine or cystine dimethylester loading in rat brain cortex. *Metab Brain Dis.* 2008 (accept).
- Ribeiro MC, de Avila DS, Schneider CY, Hermes FS, Furian AF, Oliveira MS, Rubin MA, Lehmann M, Krieglstein J, Mello CF. alpha-Tocopherol protects against pentylenetetrazol- and methylmalonate-induced convulsions. *Epilepsy Res.* 2005 Aug-Sep;66(1-3):185-94.

Rosenberg PA, Li Y, Ali S, Altiok N, Back SA, Volpe JJ. Intracellular redox state determines whether nitric oxide is toxic or protective to rat oligodendrocytes in culture. *J Neurochem.* 1999; 73:476–484

Savaraj N, Wei Y, Unate H, Liu PM, Wu CJ, Wangpaichitr M, Xia D, Xu HJ, Hu SX, Tien Kuo M. Redox regulation of matrix metalloproteinase gene family in small cell lung cancer cells. *Free Radic Res.* 2005;39(4):373-81.

Schenck JF, Zimmerman EA. High-field magnetic resonance imaging of brain iron: birth of a biomarker? *NMR Biomed.* 2004;17(7):433-45.

Schneider Oliveira M, Flavia Furian A, Freire Royes LF, Rechia Figuera M, de Carvalho Myskiw J, Gindri Fiorenza N, Mello CF. Ascorbate modulates pentylentetrazol-induced convulsions biphasically. *Neuroscience.* 2004;128(4):721-8.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. eds *The metabolic and molecular basis of inherited disease.* 8th ed. New York: McGraw Hill Inc; 2001.

Spencer JP, Jenner P, Daniel SE, Lees AJ, Marsden DC, Halliwell B. Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species. 1: *J Neurochem.* 1998 Nov;71(5):2112-22.

Stadtman ER. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;928:22-38.

Stamburly JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JL, Brown MS. Inborn errors of metabolism in the 1980's. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The metabolic basis of inherited diseases.* 6th ed. New York: McGraw Hill; 1983, p.3-59.

Tsilou ET, Rubin BI, Reed G, Caruso RC, Iwata F, Balog J, Gahl WA, Kaiser-Kupfer MI. Nephropathic cystinosis: posterior segment manifestations and effects of cysteamine therapy. *Ophthalmology.* 2006 Jun;113(6):1002-9.

Tuney I, Montilla P, Del Carmen Munoz M, Feijoo M, Salcedo M. Protective effect of melatonin on 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in synaptosomes in an animal model of Huntington's disease. *J Pineal Res.* 2004;37(4):252-6.

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003 Oct 15;552(Pt 2):335-44.

- Tyler DD. A protective function of superoxide dismutase during respiratory chain activity. *Biochim Biophys Acta*. 1975 Sep 8;396(3):335-46.
- van Deurs B, Christensen EI. Endocytosis in kidney proximal tubule cells and cultured fibroblasts: a review of the structural aspects of membrane recycling between the plasma membrane and endocytic vacuoles. *Eur J Cell Biol*. 1984 Jan;33(1):163-73.
- Vogel DG, Malekzadeh MH, Cornford ME, Schneider JA, Shields WD, Vinters HV. Central nervous system involvement in nephropathic cystinosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1990;49:591-599.
- Wajner M, Latini A, Wyse AT, Dutra-Filho CS. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J Inherit Metab Dis*. 2004;27(4):427-48.
- Wilmer MJ, de Graaf-Hess A, Blom HJ, Dijkman HB, Monnens LA, van den Heuvel LP, Levtschenko EM. Elevated oxidized glutathione in cystinotic proximal tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;337:610-4.
- Winterbourn CC, Metodiewa CD. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide *Free Radic Biol Med*. 1999; 27:322-8.
- Winterbourn CC, Peskin AV, Parsons-Mair HN (2002) Thiol oxidase activity of copper, zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem* 277:1906-11.
- Xie J, Guo Q. Apoptosis antagonizing transcription factor protects renal tubule cells against oxidative damage and apoptosis induced by ischemia reperfusion. *Jam Soc Nephrol*. 2006;17: 3336-46.
- Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(11):863-73.