

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

Efeito da cistina sobre a atividade da adenilatoquinase em córtex cerebral de ratos

Vandré Casagrande Figueiredo

Orientador: Prof. Dr. Clóvis Milton Duval Wannmacher
Co-orientadora: Prof. Dra. Luciane Rosa Feksa

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

Porto Alegre
2008

Agradecimentos

Agradeço e dedico esse trabalho à Raquel, e ao meu filho, Apolo, que, apesar de nem falar ainda, me diz muito com seus simples abraços, afagos, sorrisos e choros.

Agradeço aos meus pais, pela ajuda e apoio, em todos os sentidos.

Agradeço a todos funcionários do departamento de Bioquímica da UFRGS.

Agradeço a todos colegas de laboratório que me ajudaram durante a pesquisa, ajudando nos cálculos e nos protocolos, como as doutoras Virgínia Cielo Rech e Luciane Rosa Feksa, e os alunos de iniciação científica que colaboraram de forma significativa para a obtenção dos resultados, como a Cristine, Rodrigo, Gustavo, Maria Fernanda e Denise.

Agradeço as agências financiadoras que viabilizaram esse estudo, a Capes, pela possibilidade de ter uma bolsa de estudos durante o mestrado, ao Departamento de Bioquímica da UFRGS e a todos professores e estudantes desse departamento que fazem dele um local de grande produção acadêmica, sempre trazendo a nota máxima nas avaliações da Capes, e assim, tornando possível que muitos estudantes, como eu, tivessem acesso a bolsa de estudos.

Agradeço, especialmente, a dois professores do departamento. À professora Regina Maria Vieira da Costa Guaragna, que me apresentou à bioquímica, e que, em suas aulas ainda na graduação, me permitiu apaixonar-me pela ciência bioquímica, além de ter permitido ser monitor da sua cadeira por dois anos e meio e ter me orientado na monografia de final de curso. Ao professor e meu orientador, Clóvis Milton Duval Wannmacher, que me permitiu ter ingressado em sua linha de pesquisa, em seu laboratório, por ter tido paciência comigo quando fui fraco, e por ter me confiado um tema de pesquisa tão importante como novo, e, de certa forma, pioneiro.

E agradeço, por fim, à adenilatoquinase, o motivo disso tudo.

Sumário

| | |
|--|----|
| Lista de abreviaturas..... | 5 |
| Resumo..... | 6 |
| Abstract..... | 7 |
| I. Introdução..... | 8 |
| 1 – Erros Inatos do Metabolismo..... | 8 |
| 1.1- Histórico..... | 8 |
| 1.2. - Conceito..... | 9 |
| 1.3 – Classificação..... | 9 |
| 2. - Cistinose..... | 9 |
| 2.1. Histórico | 9 |
| 2.2 – Conceito | 10 |
| 2.3. - Cistina..... | 10 |
| 2.4. - Cistinosina e <i>CTNS</i> | 10 |
| 2.5 – Lisossomos | 11 |
| 2.6. - Transporte de Cistina nos lisossomos..... | 11 |
| 2.7. - Características da doença e Sintomatologia..... | 12 |
| 2.8 – Diagnóstico | 13 |
| 2.9 - Tratamento e mecanismos de ação terapêutica..... | 14 |
| 2.9.1 – Cisteamina..... | 14 |
| 2.9.2 – Transplante..... | 16 |
| 3. - Rede de Transferência de Fosfato..... | 16 |
| 3.1. - Introdução..... | 16 |
| 3.2. - A relação entre Creatinaquinase e Adenilatoquinase na Rede de Transferência de Fosfato..... | 16 |
| 3.2.1 - A Creatinaquinase..... | 17 |
| 3.3. - A Adenilatoquinase..... | 18 |
| 3.3.1 – Estrutura..... | 18 |
| 3.3.2 – Função..... | 19 |
| 3.3.3 – Isoenzimas..... | 19 |
| II – Objetivos..... | 20 |
| III - Resultados | 21 |
| <i>Artigo</i> | 22 |
| <i>Referências bibliográficas</i> | 32 |
| <i>Tabela</i> | 38 |

| | |
|--|----|
| <i>Figuras</i> | 40 |
| IV – Discussão..... | 43 |
| V – Conclusões..... | 45 |
| VI – Perspectivas..... | 46 |
| VII - Referências Bibliográficas Adicionais..... | 47 |

Lista de Abreviaturas

| | |
|--|---|
| ADP | Adenosina difosfato |
| AMP | Adenosina monofosfato |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| AK | Adenilatoquinase |
| CDME | Dimetil cistina éster, em inglês: cystine dimethylester |
| CK | Creatinaquinase |
| Cr | Creatina |
| CSH | Cisteamina |
| CTNS | Gene que codifica a proteína Cistinosina |
| CYS | Cisteína |
| EIM | Erros inatos do metabolismo |
| GDP | Guanosina difosfato |
| GSH | Glutationa reduzida |
| GSSG | Glutationa oxidada |
| GTP | Guanosina trifosfato |
| G6PD | Glucose 6-fosfato desidrogenase |
| H ⁺ | Próton |
| HK | Hexoquinase |
| Na ⁺ , K ⁺ -ATPase | Bomba de sódio-potássio |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida) |
| NADP ⁺ | Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada) |
| PCr | Fosfocreatina |
| PEP | Fosfoenolpiruvato |
| Pi | Fosfato inorgânico |
| PK | Piruvatoquinase |
| S-S | Ponte dissulfeto |
| -SH | Grupamento sulfidríla |

Resumo

Cistinose é uma doença genética sistêmica causada pelo transporte deficiente lisossomal acumulando cistina nos lisossomos de quase todos tecidos. Apesar do dano tecidual depender do acúmulo de cistina, os mecanismos moleculares deste ainda são obscuros. Adenilatoquinase, junto com a creatinaquinase, são responsáveis pela rede de transferência de fosfato, cruciais a homeostasia energética. Considerando que a cistina inibe a atividade da creatinaquinase, que as duas enzimas contêm grupamentos tiólicos, e há uma forte interação entre as duas atividades, nosso principal objetivo foi investigar os efeitos da cistina na atividade da adenilatoquinase em córtex cerebral de ratos Wistar. Para os estudos *in vivo*, os animais foram injetados duas vezes ao dia com 1,6 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal de cistina dimetil éster e/ou 0,46 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal de cisteamina. Os animais foram tratados do vigésimo quinto dia ao vigésimo nono dia de vida e foram sacrificados 12 horas após a última injeção. Cistina inibiu a atividade da enzima *in vitro* de forma dose-dependente, ao passo que cisteamina preveniu a inibição. A atividade da adenilatoquinase diminuiu no córtex cerebral dos ratos com sobrecarga com cistina dimetiléster e a co-administração com cisteamina preveniu a diminuição da atividade de enzima. Considerando que a adenilatoquinase, juntamente com a creatinaquinase, é essencial para a homeostase energética, a liberação de cistina pelos lisossomos com consequente inibição enzimática, podem prejudicar a homeostasia energética, contribuindo para o dano tecidual em pacientes com cistinose.

Abstract

Cystinosis is a systemic genetic disease caused by a lysosomal transport deficiency accumulating cystine in the lysosomes of almost all tissues. Although tissue damage might depend on cystine accumulation, the molecular mechanisms of tissue damage are still obscure. Adenylate kinase, along with creatine kinase, is responsible for the enzymatic phosphotransfer network, crucial for energy homeostasis. Taking into account that cystine is known to inhibit creatine kinase activity, the two enzymes have thiol groups, and the strong interaction between the two activities, our main objective was to investigate the effect of cystine on adenylate kinase activity in the brain cortex of Wistar rats. Cystine inhibited the enzyme activity *in vitro* in a concentration dependent way, whereas cysteamine prevented the inhibition. For the *in vivo* studies, the animals were injected twice a day with 1.6 $\mu\text{mol/g}$ body weight of cystine dimethylester and/or 0.46 $\mu\text{mol/g}$ body weight of cysteamine from the 25th to the 29th postpartum day and sacrificed after 12 hours. Adenylate kinase activity was found diminished in the brain cortex of rats loaded with cystine dimethylester and co-administration of cysteamine prevented the diminution of the enzyme activity. Considering that adenylate kinase together with creatine kinase is crucial for energy homeostasis, the release of cystine from lysosomes with consequent enzymes inhibition could impair energy homeostasis, contributing to tissue damage in patients with cystinosis.

I – Introdução

1 - Erros Inatos do Metabolismo

1.1. - Histórico

Talvez o primeiro documento sobre Erros Inatos do Metabolismo (EIM), tenha sido a carta do médico William Harvey a um colega alemão, em meados de 1657 (ainda que não houvesse sido formado o conceito de EIM como existe hoje). Seu colega, John Vlackveld, havia pedido sua opinião sobre um caso de um homem com uma doença rara na bexiga urinária. Na carta, Harvey escreve o parágrafo que entrou para história da medicina (Willis, 1847):

“[...] nature is nowhere accustomed more openly to display her secret mysteries than in cases where she shows traces of her workings apart from the beaten path; nor is there any better way to advance the proper practice of medicine than to give our minds to the discovery of the usual law of nature by the careful investigation of cases of rarer forms of disease. “

Em 1928, Sir Archibald Garrod, considerado o pai das doenças do metabolismo, citou essa carta, e parafraseou Harvey, no jornal *The Lancet*, dizendo:

“The study of nature’s experiments is of special value; and many lessons which rare maladies can teach could hardly be learned in other ways.”

Foi de Garrod o primeiro livro sobre o tema, em 1908, a primeira edição de *“Inborn Errors of Metabolism”*, sugerindo pela primeira vez a expressão. Na sua segunda edição (Garrod, 1928), o autor cita 6 tipos de EIM conhecidos até então. Hoje já se conhecem mais de 500 diferentes EIM (Scriver *et al*, 2001).

Garrod sugeriu que uma rota metabólica compreende uma série de enzimas, que atuam cada uma num passo específico da via. Apesar de não ter sido entendido em sua época, nem mesmo meio século após, foi Garrod quem primeiro expôs a idéia de um gene - uma enzima. Porém quando seus trabalhos foram redescobertos por outros cientistas, os conceitos da genética bioquímica, e de que as enzimas eram frutos de genes, já haviam sido desenvolvidos por outros cientistas, como Beadle e Tatum em 1941 (Dronamraju, 1992). Garrod, ao formular a idéia de um gene - uma enzima, não estava se referindo ao DNA, pois este foi descoberto algumas décadas mais tarde. Porém conseguiu

identificar que os indivíduos variam na susceptibilidade a doenças como um resultado de variações químicas de hereditariedade (Scriver *et al*, 2001).

1.2. - Conceito

Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são patologias de origem genética. Grande parte dos casos de EIM corresponde a defeito ou ausência enzimática, a qual leva a um quadro metabólico característico. Podem ocasionar defeitos em alguma das rotas e funções do metabolismo, como síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas, levando ao acúmulo ou a ausência de determinado subproduto ou metabólito (El Husny e Fernandes-Caldato, 2006). Podendo gerar algum prejuízo ao desenvolvimento mental ou/e físico do indivíduo afetado (Scriver *et al*, 2001).

A prevalência de um EIM isolado é muito pequena, pois são patologias de herança autossômica recessiva. Porém, a soma de todos EIM conhecidos, torna a incidência muito expressiva, chegando a valores como de 1/1.500 a 1/5.000 nascidos vivos (El Husny and Fernandes-Caldato, 2006, Raghuveer *et al*, 2006).

1.3. - Classificação

Clinicamente EIM se divide em dois grupos. O grupo I corresponde a doenças que afetam uma função ou órgão, como o sistema endócrino, sistema imune. O grupo II corresponde a doenças em que uma rota metabólica comum a um grande número de células ou tecidos está comprometida, ocasionando conseqüências humorais e sistêmicas. As doenças do grupo II são divididos em 3 grupos: Grupo 1 está relacionado a defeitos na síntese ou degradação de moléculas complexas; o grupo 2 com defeitos do metabolismo intermediário; o grupo 3 com liberação de energia ou sua utilização (Scriver *et al*, 2001, El Husny and Fernandes-Caldato, 2006, e Martins, 1999).

2. Cistinose

2.1 – Histórico

A cistinose nefropática foi primeiramente descrita em 1903, por Abderhalden, quando uma

criança de 21 meses de idade morreu por anorexia, e outras duas morreram sob as mesmas circunstâncias (Roth e Chan, 2003). Foi constatado que o motivo era um acúmulo anormal de cistina, porém foi confundido com cistinúria severa. Bickel e colaboradores em 1952 (Kleta e Gahl, 2002) e Dent e Harris em 1951 (Roth e Chan, 2003), demonstraram que se tratava de uma nova patologia, a cistinose. Na década de 60 do século passado, grupos de pesquisadores realizaram estudos bioquímicos demonstrando que as células cistinóticas armazenavam cistina nos lisossomos, uma organela descoberta duas décadas antes. Após, foi identificada a origem do EIM, a deficiência no transporte lisossomal de cistina (Kleta e Gahl, 2002). Os avanços sobre o entendimento da cistinose avançaram significativamente com o mapeamento do gene *CTNS* em 1996 e 1997, e a subsequente clonagem em 1998 pelo grupo de Town e Antignac (Kiehnopf *et al*, 2002).

2.2 – Conceito

Cistinose é uma desordem autossômica recessiva, causando um excessivo armazenamento lisossomal de cistina em vários tecidos. O acúmulo ocorre por um defeito na proteína transportadora de cistina nos lisossomos. Nas células cistinóticas são encontrados cristais de cistina, principalmente nos rins, fígado, região esplênica, intestino, córnea, pâncreas, tireóide, testículos, meninges, músculos, nodos linfáticos e medula óssea (McDowell *et al*, 1998). A incidência da cistinose é de um nascido vivo para cada 26.000 a 200.000 nascidos vivos (Kalatzis *et al*, 2001b).

2.3 - Cistina

A cistina é um dissulfeto formado pela oxidação de duas cisteínas. A cisteína contém um grupo sulfidril (-SH), que ao oxidar, forma uma ponte dissulfeto S-S entre duas cisteínas, formando a cistina.

2.4. - Cistinosina e *CTNS*

Cistinosina é uma proteína da membrana lisossomal responsável pelo transporte de cistina, com peso molecular de 55 kDa. O gene codificante da cistinosina é identificado como *CTNS*, que consiste de 12 exons, se localiza no cromossomo 17p13 e expressa uma seqüência de 367

aminoácidos com 7 domínios transmembrana (Kiehnopf *et al* 2002, Kalatzis e Antignac, 2002, Kalatzis e Antignac, 2003).

Na cistinose nefropática há algumas mutações do gene *CTNS* identificadas, desde pequenas deleções até quase toda deleção do gene *CTNS* (Kiehnopf *et al* 2002). A mutação do gene *CTNS* mais encontrada entre cistinóticos nefropáticos, atingindo metade dos casos da América do Norte e da Europa, é uma deleção de 57 kb. Essa mutação surgiu provavelmente na Alemanha por volta do ano 700 D.C. (Shotelersuk *et al*, 1998). Porém hoje há mais de 50 mutações do gene *CTNS* descritas. Pacientes com cistinose clássica (nefropática infantil) apresentam deleção ou mutações associadas com a perda funcional da proteína, já os casos de cistinose juvenil e ocular, são heterozigotos, mutações “nonsense”, ou mutações “splice-site”. Heterozigotos para cistinose que nunca manifestaram sinais clínicos exibem metade da capacidade normal de transporte para cistina, suficiente para manter os níveis de cistina perto da faixa normal (Nesterova e Gahl, 2007).

Das 18 mutações encontradas na forma infantil, em 15 não há qualquer transporte de cistina; 3 de 5 mutações associadas com a forma juvenil ou ocular apresentam de 9 a 20% da atividade normal de transporte de cistina (Kalatzis *et al*, 2004).

2.5. - Lisossomos

Lisossomos são organelas intracelulares contendo enzimas que digerem macromoléculas, e cujos produtos da hidrólise deixam os lisossomos por transportadores específicos na membrana, tanto para serem reutilizados quanto para serem excretados (Kalatzis e Antignac, 2002). A maior parte dos transportadores lisossomais apenas exporta, e alguns poucos importam (Mancini *et al*, 2000). O armazenamento lisossomal anormal pode ocorrer por um defeito em hidrolases promovendo acúmulo de macromoléculas, ou por um defeito sobre um transportador, que acaba acumulando substratos degradados (Kalatzis *et al*, 2004). A todas essas condições se dá o nome de Desordem de Depósito Lisossomal, sendo a cistinose um defeito no transportador de cistina.

2.6. - Transporte de Cistina nos lisossomos

O transporte de cistina via cistinosina é mediada pelo gradiente de pH, sugerindo que atua com simporte de prótons (H⁺). É também saturável e segue a cinética de Michaelis-Menten, sendo seu Km de $278 \pm 49 \mu\text{M}$. A cistinosina é altamente específica para cistina, seu transporte não é inibido com o aumento de outros aminoácidos nos lisossomos, com exceção da cisteína, que em grandes quantidades inibe o transporte de cistina (Kalatzis *et al*, 2001a, Kalatzis e Antignac, 2003).

O sistema de transporte lisossomal de cistina é considerado um contra-transporte saturável. O sistema é pH dependente, estimulada por ATP e é bidirecional (McDowell *et al*, 1998).

2.7. - Características da doença e Sintomatologia

A doença tem uma variedade de fenótipos, os quais podem ser agrupados em algumas formas clínicas baseados na idade de instalação da doença e na severidade dos sintomas (Kalatzis *et al*, 2004). Há três variantes de cistinose: a cistinose nefropática infantil, que surge nos primeiros anos de vida, e sem a terapia de depleção de cistina, resulta em falência renal no estágio final por volta dos dez anos de idade; a cistinose nefropática juvenil, que surge mais tardiamente, manifesta-se por volta dos dez a doze anos de idade, com sintomas clínicos geralmente restritos aos rins e olhos, com progressão lenta; e por último, a cistinose não-nefropática, ou ocular, com deposição de cistina nas córneas sem conseqüências renais (Kiehnopf *et al*, 2002). A doença clássica é a forma infantil, com freqüência de 95% sobre todos os casos de cistinose (Mcdowell *et al*, 1998).

A cistinose nefropática clássica é caracterizada pela síndrome de Fanconi no primeiro ano de vida, retardo mental, falência glomerular por volta dos dez anos de idade, hipotiroidismo, fotofobia, entre outras complicações (Iwata *et al*, 1998). Porém, ao nascer, essas crianças são clinicamente saudáveis, iniciando os sintomas por volta dos 6 aos 18 meses de idade, manifestando-se a síndrome de Fanconi com: poliúria, polidipsia, desidratação, acidose, desequilíbrio eletrolítico, retardo de crescimento e de ganho de peso. O crescimento da cabeça e o desenvolvimento neurológico não são afetados nesse estágio. Na infância, o crescimento se aproxima dos 60% dos infantes normais, ficando no terceiro percentil para altura no primeiro ano de vida (aos 8 anos de idade a criança com

cistinose se aproxima da altura de uma criança de 4 anos). Pelos dez anos de idade, metade das crianças afetadas e não tratadas apresentam falência renal, e apenas com diálise ou hemodiálise conseguem sobreviver até a realização de transplante renal (McDowell *et al*, 1998).

Cristais de cistina ocorrem devido à pouca solubilidade da cistina em meio aquoso. A quantidade de cristais formados não se correlaciona com o dano ao tecido, pois o fígado e o intestino apresentam grandes formações de cristais e são raras as manifestações de sintomas nesses tecidos (Nesterotova e Gahl, 2007).

Trinta por cento das crianças com cistinose nefropática, que foram transplantadas e sobreviveram até a idade adulta, não sobrevivem até os 30 anos. A morte nesses casos, costuma ocorrer por complicações multi-sistêmicas (Gahl *et al*, 2007).

Na cistinose não-nefropática, ou ocular, há formação de cristais de cistina na conjuntiva e na córnea. Em pessoas idosas não tratadas é possível ver os cristais a olho nu. (Tsilou *et al*, 2007).

A razão de haver três tipos de fenótipos tão distintos para o defeito ou ausência da cistinosina, ainda não são bem esclarecidas (Kalatzis *et al*, 2001a). Porém se sabe que a maior parte das mutações associadas com a forma infantil são deleções, inserções, mutações *Splice-site* e mutações *nonsense* que causam término prematuro da cadeia polipeptídica. Já mutações pontuais, que não rompem com a estrutura da cistinosina são associadas predominantemente com as formas juvenis e ocular (Kalatzis e Antignac, 2003). Das formas mais amenas da patologia, apenas algumas *splicing* ou mutações *missense* são responsáveis por esse fenótipo (Anikster *et al*, 1999).

2.8 – Diagnóstico

O diagnóstico da cistinose clássica ou infantil é baseada nos níveis de cistina em fibroblastos ou em leucócitos. Neste caso, os níveis de cistina estão entre 3 e 23 nmol de meia-cistina por miligrama de proteína, enquanto em pessoas saudáveis é de menos de 0,2 nmol. Pacientes com a forma juvenil têm os níveis menores de cistina do que os pacientes clássicos. Também a presença de cristais na córnea sob a ‘Lâmpadas de Fenda’ é uma forma de diagnóstico.

Outra forma de diagnóstico é via biópsia tecidual, pois os cristais também podem ser encontrados em muitos outros tecidos (McDowell *et al*, 1998).

O diagnóstico pré-natal pode ser feito via medição dos níveis de cistina em vilosidades coriônicas ou em cultura de células de fluido amniótico (McDowell *et al*, 1998).

O acúmulo de cistina destrói as células renais de forma relativamente rápida, e até o diagnóstico ter sido feito, danos significativos já ocorreram. Quanto mais cedo houver o diagnóstico e iniciar a terapia com cisteamina, maiores os benefícios em relação à saúde renal (Gahl, 2003).

2.9 - Tratamento e mecanismos de ação terapêutica

A cistinose é a única desordem lisossomal responsiva a terapia medicamentosa que corrige diretamente o defeito (McDowell *et al*, 1998). O tratamento para pacientes com cistinose é o uso crônico de cisteamina, um agente removedor de cistina acumulada. Ela oferece aos pacientes o crescimento físico, a manutenção da capacidade glomerular renal, e a preservação da função tireoidiana (Iwata *et al*, 1998).

Porém pacientes tratados com cisteamina oral ainda apresentam cristais nas córneas, podendo gerar fotofobia, que, então, deve ser aplicado cisteamina topicamente nos olhos (Iwata *et al*, 1998).

Ainda não se sabe o mecanismo pelo qual o depósito de cistina leva à lesão tecidual na cistinose nefropática, acredita-se que seja mediando a apoptose celular (Nesterova e Gahl, 2007), provavelmente por cisteinilização (cistina reage com algum grupamento tiólico livre ou ligado a uma cadeia polipeptídica) (Thoene, 2007).

2.9.1 – Cisteamina

O tratamento da cistinose envolve o uso da cisteamina, um aminotiol usado pela primeira vez contra a cistinose em 1976, por Thoene *et al*. Desde então é reconhecido como o método mais eficaz para o tratamento das células cistinóticas. A cisteamina, ou β -mercaptoetilamina (HS-CH₂-CH₂-NH₂), é um agente removedor de cistina acumulada, aprovado pela FDA em 1994. O grupo

tiol reage com a cistina, formando uma ponte dissulfeto, $[\text{HOOC}(\text{NH}_2)\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}]$ formando cisteína e cisteína-cisteamina. Este último, um análogo da lisina, sai dos lisossomos via transportador da lisina, e a cisteína deixa a célula livremente. Noventa a noventa e cinco por cento da cistina pode ser removida das células cistinóticas desta forma (McDowell *et al*, 1998, Iwata *et al*, 1998, Nesterova e Gahl, 2007, Gahl, 2003).

A eficiência da terapia com cisteamina tem sido repetidamente demonstrada, e tem sido o tratamento para cistinose em todo o mundo. Deve ser administrada em doses de 60-90mg/kg ou 1,3-1,95g/m² (McDowell *et al*, 1998). Estudos farmacocinéticos demonstraram que essa administração deve ser a cada 6 horas, inclusive a noite, para manter a quantidade de cistina nos leucócitos abaixo de 1 nmol / mg de proteína (Levtchenko *et al*, 2006b, Belldina *et al*, 2003, Nesterova e Gahl, 2007).

Seus efeitos colaterais descritos são náuseas, vômitos, desconforto gastrointestinal, e raramente letargia e sonolência em altas doses (Mcdowell *et al*, 1998, Gahl, 2003, Nesterova e Gahl, 2007). Cisteamina é comercializada como sal de bitartrato em cápsulas sob o nome de Cystagon. É descrito que a cisteamina comercializada tem gosto e cheiro repulsivos em qualquer dose (Gahl, 2003) e que cerca de 10 a 15% dos pacientes não toleram toda a dose da droga (Nesterova e Gahl, 2007). Uma alternativa em casos de não tolerância à terapia com cisteamina oral é a aplicação intravenosa de cisteamina HCl, porém esse tratamento pode ser hepatotóxico (Bendel-Stenzel *et al*, 2008). O desconforto no trato gastrointestinal se dá pelo aumento da secreção gástrica, inclusive em baixas doses (Dohil *et al*, 2003).

Quanto mais cedo for ministrada a cisteamina, menores serão os efeitos nocivos da cistinose, tanto sobre os rins quanto outros tecidos, além de impedir alterações em outras variáveis do desenvolvimento, como o crescimento (Markello *et al*, 1993). Já foi delineada a evolução natural da cistinose nefropática sobre a função renal e a mortalidade. Nos indivíduos com cistinose a deterioração da função glomerular é praticamente uniforme sem uso de cisteamina (Manzl e Gretz, 1994).

2.9.2 – Transplante

O transplante renal prolonga a vida de pacientes cistinóticos. Porém o acúmulo de cistina continua em outros órgãos, incluindo músculo, cérebro, medula óssea, fígado, região esplênica, nódulos linfáticos, córnea, conjuntiva, tireóide, pâncreas, testículos e intestinos. Desta forma a cistinose nefropática passa de uma doença renal a uma desordem multi-sistêmica, não atingindo mais os rins (Nesterova e Gahl, 2007, e Shotelersuk *et al*, 1998, McDoweel *et al* 1998). Apesar do transplante, os pacientes ainda devem fazer uso de cisteamina, para preservar os demais tecidos (Markello *et al*, 1993, Tsilou *et al*, 2006).

3. Rede de transferência de Fosfato

3.1. - Introdução

Toda a atividade celular requer uma carga energética. Essa demanda é suprida pelas rotas que geram ATP (ou UTP, CTP, GTP). Essas rotas são, na sua maioria, oxidativas, como a glicólise. Assim, o ATP formado (tanto na mitocôndria, como no citosol) pode ser usado nas diversas atividades celular, como a contração das proteínas contrateis e a síntese de peptídeos (Noma, 2005).

A energia armazenada nas ligações do ATP pode ser rapidamente utilizada, e ao ser, ela é convertida em ADP mais um fosfato inorgânico ou ao AMP e dois fosfatos inorgânicos. Em média, as concentrações de ATP, ADP e AMP são, respectivamente, 5, 1 e 0,1 mM (Noma, 2005). Assim modificações nas concentrações podem alterar enzimas importantes e regulatórias em diversas rotas biossintéticas e oxidativas, que percebem mudanças no estado metabólico e energético celular.

A simples difusão do ATP não parece ser a responsável pelo fluxo de energia na célula. O mecanismo que supre a demanda energética é a rede de transferência de fosfato, que fazem parte as enzimas Adenilatoquinase (AK) e Creatinaquinase (CK) (Noma, 2005, Dzeja *et al*, 1996).

3.2. - A relação entre Creatinaquinase e Adenilatoquinase na Rede de Transferência de Fosfato.

Há uma inter-relação funcional entre as atividades da AK e CK, pois em experimentos onde uma dessas enzimas tem sua atividade diminuída por uso de inibidores enzimáticos, por exemplo, a outra enzima acaba elevando sua atividade para suprir a demanda deixada pela primeira (Dzeja *et al*, 1996). Isso é demonstrado quando se diminui a atividade da CK, provocando aumento da atividade da AK (Dzeja *et al*, 1999), e vice-versa (Dzeja *et al*, 2002). Assim AK e CK acabam fazendo parte de um mesmo sistema de transferência de grupos fosforil. Porém em situações de estresse metabólico, o transporte de energia fica comprometido quando uma das enzimas (CK e AK) está com atividade baixa ou ausente (Pucar *et al*, 2001).

A AK gera 10% do total do *turnover* de ATP no tecido muscular cardíaco, enquanto no músculo esquelético em repouso é cerca de 4%. A CK perfaz a maior parte do *turnover* do ATP (Dzeja *et al*, 1999). Apesar da porcentagem diminuída em relação a CK, a AK pode transferir e utilizar dois fosfatos do ATP, denominados fosfatos gama e beta, podendo assim, em momentos de intensa demanda de ATP, fornecer energia (Pucar *et al*, 2000).

3.2.1 - A Creatinaquinase

A Creatinaquinase (EC 2.7.3.2) é uma enzima-chave no transporte de energia, que catalisa a reação: $MgADP^+ + PCr^{2-} + H^+ \leftrightarrow MgATP^{2-} + Cr$. A enzima retira um grupo fosforil do ATP e fosforila a creatina, assim formando a fosfocreatina e um ADP, que em momentos de necessidade energética, doa novamente o fosfato da fosfocreatina, para o ADP, formando ATP (Stachowiak *et al*, 1998).

A CK é uma enzima tiólica, tendo um grupamento sulfidrila (uma cisteína) no sítio ativo (Furter *et al*, 1993), este local pode ser alvo de oxidação, o que leva a uma inibição da atividade catalítica da enzima (Oliveira *et al*, 2007, Fleck *et al*, 2005).

A CK possui isoenzimas tecido-específicas e compartimentalizadas, como CK mitocondrial e citosólica, encontrada na forma dimérica, com duas subunidades de 40 kDa (Hornemann *et al*, 2000). Porém CK mitocondrial também pode ser encontrada na forma octamérica (Stachowiak *et al*, 1998).

Segundo Wallimann *et al*, 1992, a CK e o sistema de fosfocreatina tem 5 funções principais:

1) Tampão energético temporal: armazena ATP para uso posterior; 2) Tampão energético espacial: transporte de ATP do local de síntese ao de consumo; 3) Preveni o aumento intracelular de ADP; 4) Tampão de prótons, pois a reação da CK para formar ATP, utiliza um próton, produzido na hidrólise de ATP; e 5) Mantém a relação de ATP/ADP em determinados locais subcelulares, onde há consumo de ATP, aumentando a eficiência termodinâmica da hidrólise de ATP.

3.3. - A Adenilatoquinase

Inicialmente foi chamada de mioquinase, por ser encontrada com mais facilidade e maior concentração em células musculares (Colowick e Kalckar, 1943). Na década de 40, observaram que gerava ATP e ADP, sendo a reação chamada, na época, de “dismutação de fosfato” (Kalckar, 1943).

3.3.1 - Estrutura

A AK (EC 2.7.4.3) é uma pequena enzima tiólica (com única cadeia polipeptídica de 200 aminoácidos, que na *escherichia coli* tem 23,6 kDa) (Sear, 2004, Shapiro *et al*, 2002). Realiza grandes mudanças conformacionais durante seu ciclo catalítico. Possui 3 domínios bem caracterizados: o CORE, o domínio de ligação do AMP e o domínio de ligação do ATP (chamado de LID). Há evidências de que a abertura dos sítios ligantes de AMP e ATP é o passo limitante do ciclo catalítico. O domínio CORE, o principal e o maior dos três, parece conferir propriedades alostéricas a enzima (Bae e Philips, 2006, Muller *et al*, 1996, Shapiro *et al*, 2002). Os domínios de ligação de AMP e ATP, também podem se ligar ao ADP, para a reação reversa (Willemoes e Kilstrup, 2005).

Os dois domínios de ligação do AMP e ATP, ao se ligarem aos substratos, se deslocam fechando-se sobre o CORE, denominando-se forma “fechada”. Durante esta catálise, exclui-se a água, diferentemente das ATPases, que a necessitam.(Gerstei *et al*, 1993, Ma *et al*, 2001). Ao liberarem os produtos, e ficar na forma livre, a enzima volta à forma “aberta”. Desta forma, os domínios de ligação do AMP e do ATP são os domínios móveis, responsáveis pela catálise da AK (Shapiro *et al*, 2002).

3.3.2 – Função

AK é responsável pela conversão reversível entre os fosfatos do ATP, ADP e AMP (Noma, 2005, Bae e Philips, 2006, Willemoes e Kilstrup, 2005, Savabi, 1994, Pucar *et al*, 2002, Muller *et al*, 1996, Pucar *et al*, 2000), da seguinte forma: $2ADP \leftrightarrow ATP + AMP$. Sua atividade é regulada pela concentração dos nucleotídeos participantes (Willemoes e Kilstrup, 2005, Pucar *et al*, 2002, Muller *et al*, 1996, Carrasco *et al*, 2001), por alosteria e coenzimas (Mg^{2+}) (Callaghan e Weber, 1959).

AK dobra o potencial energético do ATP, por ter a habilidade de regenerar o ATP, a partir de dois ADP, e pela regulação dos processos envolvendo os nucleotídeos de adenina. A AK gera sinais metabólicos para a célula, por exemplo, produzindo AMP, assim ativando rotas dependentes de AMP (Pucar *et al*, 2002, Carrasco *et al*, 2001, Dzeja *et al*, 2002, Pucar *et al*, 2000, Pucar *et al*, 2001). Como a transferência de grupos fosforil entre fosfatos é energeticamente neutra, não há ganho nem perda de energia nesse processo para o ambiente (Muller *et al*, 1996).

3.3.3 – Isoenzimas

Até o momento, são conhecidas seis isoenzimas (da AK1 a AK6) (Noma, 2005). A AK1 existe no citoplasma e AK2 existe prioritariamente no espaço intermembranas mitocondrial, ambas utilizam os nucleotídeos de adenina. A AK3 utiliza GTP para a formação de ADP ou GDP, devido à sua localização subcelular, pois é encontrada na matriz mitocondrial, onde há a formação de GTP no ciclo do ácido cítrico. A AK4 está localizada principalmente na matriz mitocondrial, e AK5 no citosol. AK6 é a única a ser encontrada no núcleo celular (Noma *et al*, 2005).

As isoenzimas têm K_m e pH ótimo diferentes para AMP e ATP. A AK2 muscular tem K_m menor comparado ao K_m da AK1 muscular, por exemplo. Assim acabam catalisando prioritariamente a reação para uma das direções, direta, sintetizando ATP ou reversa, ADP. A AK 2 mitocondrial tem K_m mais baixo para AMP e ATP, e assim catalisando a direção reversa, sintetizando ADP, para regular a respiração mitocondrial (Savabi, 1994).

II – Objetivos

Considerando que em modelos experimentais de cistinose (por administração de dimetil cistina éster - CDME), a cistina:

- gera estresse oxidativo e
- diminui as atividades da creatinaquinase (CK) e piruvatoquinase (PK).

E considerando que, assim como essas duas enzimas, a adenilatoquinase (AK) também é uma enzima tiólica importante para a homeostasia energética celular, este trabalho teve como objetivo geral:

1- Determinar a influência da cistina sobre a atividade da AK em córtex cerebral de ratos Wistar.

E como objetivos específicos:

1- Determinar os efeitos de diferentes concentrações de cistina sobre a atividade da AK *in vitro* em homogeneizados de córtex cerebral de ratos Wistar.

2- Determinar os efeitos da cisteamina sobre a atividade da AK no mesmo homogeneizado *in vitro* com a presença ou não da cistina no sistema de incubação.

3- Investigar os efeitos da administração *in vivo* de CDME e de cisteamina sobre a atividade da AK em córtex cerebral de ratos Wistar.

III – Resultados

Vandré Casagrande Figueiredo, Luciane Rosa Feksa, Clovis Milton Duval Wannmacher.

Cysteamine prevents inhibition of adenylate kinase caused by cystine in rat brain cortex.

Submetido à revista Metabolic Brain Disease.

Cysteamine prevents inhibition of adenylate kinase caused by cystine in rat brain cortex.

Vandré Casagrande Figueiredo, Luciane Rosa Feksa, Clovis Milton Duval Wannmacher

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

Corresponding author: Clovis M. D. Wannmacher

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

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

Running title: Cysteamine prevents enzyme inhibition by cystine

Abstract

Cystinosis is a systemic genetic disease caused by a lysosomal transport deficiency accumulating cystine in the lysosomes of almost all tissues. Although tissue damage might depend on cystine accumulation, the mechanisms of tissue damage are still obscure. Adenylate kinase, along with creatine kinase, is responsible for the enzymatic phosphotransfer network, crucial for energy homeostasis. Taking into account that cystine is known to inhibit creatine kinase activity, the two enzymes have thiol groups, and the strong interaction between the two activities, our main objective was to investigate the effect of cystine on adenylate kinase activity in the brain cortex of Wistar rats. For the *in vivo* studies, the animals were injected twice a day with 1.6 $\mu\text{mol/g}$ body weight of cystine dimethylester and/or 0.46 $\mu\text{mol/g}$ body weight of cysteamine from the 25th to the 29th postpartum day and sacrificed after 12 hours. Cystine inhibited the enzyme activity *in vitro* in a concentration dependent way, whereas cysteamine prevented the inhibition. Adenylate kinase activity was found diminished in the brain cortex of rats loaded with cystine dimethylester and co-administration of cysteamine prevented the diminution of the enzyme activity. Considering that adenylate kinase together with creatine kinase is crucial for energy homeostasis, the release of cystine from lysosomes with consequent enzymes inhibition could impair energy homeostasis, contributing to tissue damage in patients with cystinosis.

Key words: adenylate kinase, cystine, cysteamine, cystine dimethylester, cystinosis

Introduction

Cystinosis is an inherited systemic disease caused by abnormal storage of cystine in lysosomes due to a deficient cystinosin activity, a lysosomal cystine carrier responsible for cystine efflux from this organelle (Tom *et al*, 1998). Accumulation of cystine results in multiorgan damage, with renal lesion being the most pronounced. Brain cystine concentration may achieve 4 nmol/mg wet tissue, approximately 5 mM (Gahl *et al*, 2001). Patients with cystinosis are usually treated with cysteamine (CSH), a cystine-depleting drug (Gahl *et al*, 2002). Cysteamine is a product of coenzyme A metabolism and is found in small concentrations in cell cytoplasm. This aminothioliol is able to cross the lysosomal membrane in both its reduced and oxidized (cystamine) forms and reduces cystine content in lysosomes (Lloyd, 1986, Pisoni *et al*, 1995). Early oral CSH therapy with high doses may also proved to be beneficial in preventing non-renal complications of cystinosis, reducing distal myopathy, swallowing difficulties, and central nervous system involvement found in some untreated adults (Gahl, 2003).

Although not entirely similar to the human disease (Wilmer *et al*, 2007), an *in vivo* way to study cystinosis is the lysosomal load with cystine dimethyl ester (CDME), a protocol used in our laboratory (Kessler *et al*, 2008, Rech *et al* 2007) and elsewhere (Foreman *et al*, 1995). CDME load is known to cause defective proximal tubular damage, similar to that of Fanconi syndrome in cystinosis, suggesting that Fanconi syndrome was caused by reduced mitochondrial adenosine triphosphate (ATP) generation, leading to decreased activity of proximal tubular Na⁺, K⁺-ATPase and consequent diminution of Na⁺-coupled proximal transport of glucose, amino acids, ions, and water (Coor *et al*, 1991, Ben-Nun *et al*, 1992, Foreman *et al*, 1995, Çcetinkaya *et al*, 2002). However, recent studies showed that mitochondrial energy generation capacity in cystinotic fibroblasts and in human immortalized proximal tubular epithelial cells appears to be normal, and the observed mild decrease of intracellular ATP content seems insufficient to cause alterations of

Na⁺, K⁺-ATPase activity (Laube *et al*, 2006, Wilmer *et al*, 2005), suggesting that other mechanisms might account for the reduced enzyme activity. Cystine dimethylester load induces oxidative stress in brain (Kessler *et al*, 2008) and in kidney (Rech *et al*, 2007). Cystine impairs the *in vitro* activity of pyruvate kinase (PK) in brain cortex (Feksa *et al*, 2004) and heart of rats (Rosa *et al*, 2004), almost the same fashion seen in the activity of creatine kinase (CK) in pig retina (Oliveira *et al*, 2007) and in brain cortex of rats (Fleck *et al*, 2005), probably through oxidation of thiol groups of the enzymes.

Adenylate kinase (AK) (EC 2.7.4.3) is a thiol-containing enzyme like PK and CK, catalyzing the reversible transfer of phosphate between ATP and AMP (Willemoes and Kilstrup, 2005). This enzyme, along with creatine kinase, is responsible for the enzymatic phosphotransfer network, in other words, responsible for the transfer of the phosphate of ATP where it is produced (mitochondria) to the place where it is consumed (cytosol) (Dzeja and Terzic, 2003). Both enzymes, CK and AK, are intimately associated in such a way that when one enzyme activity is reduced, the activity of the other enzyme is enhanced (Dzeja *et al*, 1999, Dzeja *et al*, 2002).

Taking into account the strong interaction between CK and AK activities, the presence of functional thiol groups in the two molecules, and the inhibitory effect of cystine on CK activity, our main objective was to investigate the effect of cystine, CDME and CSH on AK activity.

Methods

Animals and reagents

Wistar rats bred in the Department of Biochemistry, UFRGS, were used in the experiments. The animals were kept with dams until they were sacrificed. The dams had free access to water and to a standard commercial chow (Supra, Porto Alegre, RS, Brazil) containing 20.5% protein (predominantly soybean supplemented with methionine), 54% carbohydrate, 4.5% fiber, 4% lipids,

7% ash and 10% moisture. The animals were maintained on a 12:12 h light/ dark cycle (lights on 07.00–19.00 h) in conditioned constant temperature ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) colony room. The principles of laboratory animal care (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH publication no. 80–23, revised 1996; <http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/>) were followed in all experiments and our research protocol was approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. All efforts were made to minimize animal suffering and to use only the number of animals necessary to produce reliable scientific data. All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Cystine dimethyl ester and cysteamine solutions were buffered to pH 7.4 with NaOH immediately before the administration to the animals. Adenylate kinase activity and protein content were measured with a spectrophotometer with controlled temperature (Hitachi U-2001; Hitachi, Tokyo, Japan).

***In vitro* experiment**

For the *in vitro* assays non-treated 30-day-old rats were used. First were made assays to determine the influence of cystine concentration (0.5, 1, 2 and 4 mM) *in vitro* in brain cortex homogenate. Next, the effect of 2 and 4 mM CSH alone or associated to cystine 4 mM was tested. The homogenates were incubated for 30 min at 37°C with the same reaction mixture described below with cystine and/or CSH, with the exception of control.

***In vivo* experiment**

Twenty-eight rats were randomly separated into four groups and were treated from the 25th to the 29th postpartum day. The animals received administration of 20 ml/g body weight of one of the following buffered solutions with NaOH (pH 7.4), twice a day at 12 h interval: 0.85 g% saline (control group), 80 mM CDME (CDME group), 13 mM CSH (CSH group), or 80 mM CDME + 13 mM CSH (CDME + CSH group). CSH was administered subcutaneously and CDME was

administered intraperitoneally. Every solution was prepared just before administration. CDME dose was equivalent to that used to load lysosomes in adult rats (Ben-Nun *et al*, 1993, Foreman *et al*, 1987) and cysteamine dose was equivalent to that used for the treatment of the patients (Gahl *et al*, 2001). Twelve hours after treatment the rats were sacrificed by decapitation without anesthesia. At this age, brain Wistar rat development is equivalent to the development of one-years-old child.

Tissue preparation and incubation

Treated (*in vivo*) and non-treated (*in vitro*) animals were sacrificed by decapitation without anesthesia, and the cerebral cortexes were rapidly removed and homogenized with a Teflon-glass homogenizer (B. Braun Biotech International, Melsungen, Germany) in 10 volumes of cold solution of 20mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 62 mM sucrose and 1mM EGTA. Homogenates were centrifuged at 800 x g for 10 min at 4°C with Sorvall RC5B Plus centrifuge (Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, Kansas, USA) to discard nuclei and cell debris (Llesuy *et al*, 1985, Gonzalez *et al*, 1991). The supernatant solution containing mitochondria, cytosol and other cellular components such as endoplasmic reticulum and lysosomes, was collected for determination of AK activity and protein content. The supernatants were stored for no more than 1 week at -70°C when the assay was not carried out immediately.

Adenylate Kinase Activity

Adenylate kinase activity was measured with a coupled enzyme assay with hexokinase (HK) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), in a method developed by Oliver (1955) with the modifications of Dezja (1999). The reaction mixture consisted of 100 mM KCl, 20 mM HEPES, 20 mM glucose, 4 mM MgCl₂, 2 mM NADP⁺, 1 mM EDTA, 4.5 U/ml of HK, 2 U/ml of G6PD and 1µg of protein homogenate. The reaction was initiated by the addition of 2 mM ADP and the reduction of NADP was followed at 340 nm in a spectrophotometer for 3 minutes. ADP, NADP⁺, cystine,

CSH, glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase were dissolved in water. Reagents concentration and assay time (3 min) were chosen to assure the linearity of the reaction. CDME or CSH did not interfere with HK or G6PD activities or with spectrophotometric readings. The results were expressed in μmol of ATP formed per min per mg of protein.

Protein determination

The protein content was determined by the method of Lowry *et al* (1951) using bovine serum albumin as the standard. CDME and CSH did not interfere in the reaction.

Statistical analysis

Data were analyzed by one, two or three-way ANOVA, depending on the experimental design. Post hoc analysis of a significant interaction was performed by one-way ANOVA followed by the Tukey test when the F value was significant and when required. Concentration-dependence was analyzed by linear regression. All data were analyzed by the Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS 12.0 for Windows) (Leech *et al*, 2005).

Results

First, AK activity from brain cortex homogenate was assayed *in vitro* in the presence of 1mM, 2 mM and 4 mM cystine concentration. Linear regression showed that the amino acid inhibited the enzyme activity in a concentration-dependent way ($F(1,20) = 51.18$; $\beta = -0.79$; $p < 0.001$) (Fig 1).

Next, AK activity was assayed in the presence of 4 mM cystine and 2 mM or 4 mM CSH. Three-ways ANOVA (4 mM cystine, 2 mM CSH and 4 mM CSH were taken as factors) for cystine by 2 mM CSH interaction ($F(1,31) = 13.66$; $p < 0.001$) and for cystine by 4 mM CSH interaction ($F(1,31) = 16.43$; $p < 0.001$), showed that CSH prevented the inhibition caused by cystine (Fig 2).

For the next experiment, rats were treated with CDME and /or CSH for six days. Two-ways ANOVA

(CDME and CSH were taken as factors) showed significant interaction between CSH and CDME ($F(1,24) = 5.34$; $p < 0.05$), indicating that CDME loading reduced AK activity and CSH co-administration prevented this effect (Fig 3). Two-ways ANOVA also showed that brain cortex weight ($F(1,24) = 0.43$; $p > 0.8$), as well as protein content ($F(1,24) = 0.81$; $p > 0.7$), did not differ between the groups at the end of the treatment, indicating that the biochemical differences observed between the groups cannot be attributed to brain undernutrition (Table 1).

Discussion

As far as we know, this is the first work to show AK inhibition by cystine or CDME. Cystine inhibited AK activity in a dose dependent way (Fig 1). This possibly occurred by oxidation of the sulfhydryl groups of the enzyme, because addition of CSH, an aminothiols protector of sulfhydryl groups, prevented the inhibition caused by cystine (Fig 2.). AK molecule has two sulfhydryl groups, although none of this is on the activity site of the enzyme (Weeds and Noda, 1968). AK has a sulfhydryl group on Cys-187, at the surface of the enzyme, and Cys-25, that is not on activity site, but in its vicinity (Price *et al*, 1975). Only Cys-25 seems to be important for the active form of AK (Price *et al*, 1975). It was early reported that cystine inhibited the activity of CK and PK, two enzymes containing thiol groups necessary for their activity (Feksa *et al*, 2004, Rosa *et al*, 2004, Oliveira *et al*, 2007, Fleck *et al*, 2005). On the other hand, CDME loading induces oxidative stress in kidney and brain cortex of rats, and CSH prevents oxidative damage acting as strong scavenger of free radicals (Rech *et al*, 2007, Kessler *et al*, 2008).

CDME load could provoke up regulation of AK, because CK activity might also be inhibited, causing enhancement of AK activity (Dzeja *et al*, 1999, Dzeja *et al*, 2002). Besides, when some AK isoenzymes of the same tissue are inhibited, the non-inhibited isoenzymes can increase, achieving the whole activity (Pucar *et al*, 2000). On the other hand, considering the strong inhibition cystine caused *in vitro*, it was expected that the same effect might occur *in vivo*. Our data

showed that AK activity was diminished in brain cortex of animals loaded with CDME (Fig.3). The prevention of AK activity inhibition by CSH administration (Fig 3), similar to the prevention by CSH of CK activity reduction caused by CDME reinforces the hypothesis that AK and CK inhibition may be caused by similar mechanisms.

It is not possible to evaluate the real AK activity in the brain cortex *in vivo*, because the activity was measured *in vitro*, after animal death. Besides, AK activity was measured in optimal conditions, different of those found in the tissue, and in the presence of small concentration of CDME, because brain cortex was collected 12 h after the last drug administration and was diluted about one thousand times for the enzyme activity measurement. However, considering the low AK activity measured in brain cortex after CDME loading, it is reasonable to presume that the number of active molecules of the enzyme was reduced *in vivo*.

Considering that CK and AK, are intimately associated in such a way that when one enzyme activity is reduced, the activity of the other enzyme is enhanced (Dzeja *et al*, 2002), the simultaneous inhibition of the two enzymes could disrupt energy homeostasis with severe consequences for cell function and survival. Considering that PK is also inhibited by cystine, the diminished activity of PK, CK and AK, and possibly of other thiol-containing enzymes, might at least partially explain the decreased ATP content with normal energy generating capacity of mitochondria found in human cystinotic fibroblasts (Levtchenko *et al*, 2006). Besides, inhibition of PK activity could reduce pyruvate levels, an important antioxidant agent (Das, 2006). Impairment of energy homeostasis and reduction of antioxidant defenses could provoke oxidative stress with consequent apoptosis and brain cells death (Burlacu *et al*, 2001, Park and Thoene, 2005).

CDME load is known to induce oxidative stress, and CSH to prevent it (Rech *et al*, 2007). Methanol released from CDME hydrolysis in the cells has probably no significant toxic effect, because other amino acid esters are not harmful to the cells (Salmon and Baum, 1990; Ben-Nun *et al*, 1992). Therefore, it is possible that the toxic effect of CDME could be caused by a high

oxidative potential of this ester. However, it must be emphasized that in cystinosis the cystine accumulated is synthesized in the lysosomes, and is not transported from the cytosol as is the case in the CDME model of cystinosis. Therefore, oxidative stress does not occur in cystinotic tissue unless the lysosomal cystine is released from lysosomes. In this case, only considerable amounts of released cystine could overcome cellular GSH and cause inhibition of AK and others thiol-containing enzymes, damaging cells. Considering the limitations of CDME model of cystinosis, further studies are necessary to evaluate the status of energy homeostasis in patients affected by cystinosis before and after CSH treatment. If thiol-containing enzymes inhibition and oxidative stress occur in patients with cystinosis, it is possible that lysosomal cystine depletion may be not the only beneficial effect of CSH administration, but also its antioxidant and thiol-protector effect.

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), Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX-CNPq /FAPERGS -Brazil) and Rede Instituto Brasileiro de Neurociências (FINEP /IBN-Net #01.06.0842-00)

References

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

Ben-Nun, A., Bashan, N., Potashnik, R., Cohen-luria, R., and Moran, A. (1992). Cystine dimethyl ester reduces the forces driving sodium-dependent transport in Llc-Pk1 cells. *Am. J. Physiol.* 263: C516-C520

Burlacu, A., Jinga, V., Gafencu, A.V., and Simionescu, M. (2001). Severity of oxidative stress generates different mechanisms of endothelial cell death. *Cell Tissue Res.* 306: 409-416.

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

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

Das, U.N. (2006). Pyruvate is an endogenous anti-inflammatory and anti-oxidant molecule. *Med. Sci. Monit.* 12: RA79-84

Dzeja, P.P., and Terzic, A. (2003). Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J. Exp. Biol.* 206: 2039-2047.

Dzeja, P.P., Bortolon, R., Perez-Terzic, C., Holmuhamedov, E.L., and Terzic, A. (2002). Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 10156-10161.

Dzeja, P.P., Vitkevicius, K.T., Redfield, M.M., Burnettm J.C., and Terzic, A. (1999). Adenylate Kinase–Catalyzed Phosphotransfer in the Myocardium: Increased Contribution in Heart Failure. *Circ. Res.* 84:1137-1143.

Feksa, L.R., Cornelio, A., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T.S., Wajner, M., and Wannmacher, C.M.D. (2004). Inhibition of pyruvate kinase activity by cystine in brain cortex of rats. *Brain. Res.* 1012: 93– 100.

Fleck, R.M.M., Rodrigues-Junior, V., Giacomazzi, J., Parissoto, D., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T.S., Wajner, M., and Wannmacher, C.M.D. (2005). Cysteamine prevents and reverses the inhibition of creatine kinase activity caused by cystine in rat brain cortex. *Neurochem. Int.* 46: 391–397.

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.

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

Gahl, W.A. (2003) Early oral cysteamine therapy for nephropathic cystinosis. *Eur. J. Pediatr.* 162(1): 38–41.

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

Gahl, W.A., Thoene, J.G., and Schneider, J.A. (2001). Cystinosis: a disorder of lysosomal membrane transport. In: Scriver, C.R., Beaudet A.L., Sly, W.S., Valle, D. (eds) *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*. McGraw- Hill, New York, pp 5085–5108

Gonzalez, F.B., Llesuy, S., and Boveris, A. (1991). Hydroperoxide initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 10: 93–100

Kessler, A., Biasibetti, M., da Silva Melo, D.A., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T.S., and Wannmacher, C.M.D. (2008). Antioxidant Effect of Cysteamine in Brain Cortex of Young Rats. *Neurochem. Res.* 33: 737-744.

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

Leech, N.L., Barrett, K.C., and Morgan, G.A. (2005). *SPSS for intermediate statistics. Use and interpretation*, Lawrence Erlbaum Associates Publishers (ed), London, pp 46–62.

Levtchenko, E.N., Wilmer, M.J.G., Janssen, A.J.M., Koenderink, J.B., Visch, A.J. Willems, P.H., Graaf-Hess, A., Blom, H.J., van den Heuvel, L.P., and Monnens, L.A. (2006). Decreased ATP content

and intact mitochondrial energy generating capacity in human cystinotic fibroblasts. *Pediatr. Res.* 59: 287-292.

Llesuy, S.F., Milei, J., and Molina, H. (1985). Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 40-epiadriamycin in mice. *Tumori.* 71(3): 241–249

Lloyd, J.B. (1986). Disulphide reduction in lysosomes. The role of cysteine. *Biochem. J.* 237(1): 271–272

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., and Farr, A.L. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275

Oliveira, P.R.P., Rodrigues-Junior, V., Rech, V.C., and Wannmacher, C.MD. (2007). Cystine Inhibits Creatine Kinase Activity in Pig Retina. *Arch. Med. Res.* 38: 164-169

Oliver, I.T. (1955). A Spectrophotometric Method for the Determination of Creatine Phosphokinase and Myokinase. *Biochem. J.* 61(1): 116-122.

Park, M.A., and Thoene, J.G. (2005). Potential role of apoptosis in development of the cystinotic phenotype. *Pediatr. Nephrol.* 20: 441-446.

Pisoni, R.L., Park, G.Y., Velilla, V.Q., and Thoene, J.G. (1995). Detection and characterization of a transport system mediating cysteamine entry into human fibroblast lysosomes. Specificity for aminoethylthiol and aminoethylsulfide derivatives. *J. Biol. Chem.* 270: 1179– 1184

Price, N.C., Cohn, M., and Schirmer, R.H. (1975). Fluorescent and Spin Label Probes of the Environments of the Sulfhydryl Groups of Porcine Muscle Adenylate Kinase. *J. Biol. Chem.* 250: 644-652.

Pucar, D., Janssen, E., Dzeja, P.P., Juranic, N., Macura, S., Wieringa, B., and Terzic, A. (2000). Compromised Energetics in the Adenylate Kinase AK1 Gene Knockout Heart under Metabolic Stress. *J. Biol. Chem.* 275: 41424–41429.

Rech, V.C., Feksa, L.R., Amaral, M.F.A., Koch, G.W., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S, Wyse, A.T.S, and Wannmacher, C.M.D.(2007). Promotion of oxidative stress in kidney of rats loaded with cystine dimethyl ester. *Pediatr. Nephro. L* 22: 1121–1128

Rosa, T.G., Wyse, A.T.S., Wajner, M., and Wannmacher, C.M.D. (2004). Cysteamine prevents and reverses the inhibition of pyruvate kinase activity caused by cystine in rat heart. *Biochim. Biophys. Acta* 1689: 114– 119

Salmon, R.F., and Baum, M. (1990). Intracellular Cystine Loading Inhibits Transport in the Rabbit Proximal Convolutated Tubule. *J. Clin. Invest.* 85: 340-344

Town, M., Jean, G., Cherqui, S., Attard, M., Forestier, L., Whitmore, S., Callen, D., Gribouval, O., Broyer, M., Bates, G., van't Hoff, W., and Antignac, C. (1998) A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat. Genet.* 18: 319–324

Weeds, A.G., and Noda, L. (1968). Amino Acid Sequences around the Thiol Groups of Myokinase. *Biochem J.* 107: 311-312

Willemoes, M., and Kilstrup, M. (2005). Nucleoside triphosphate synthesis catalysed by Adenylate Kinase is ADP dependent. *Arch. Biochem. Biophys.* 444: 195–199

Wilmer, M.J., Willems, P.H., Verkaart, S., Visch, H.J., de Graaf-Hess, A., Blom, H.J., Monnens L.A., van den Heuvel, L.P., and Levtchenko, E.N. (2007). Cystine dimethylester model of cystinosis: still reliable? *Pediatr. Res.* 62: 151-5.

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

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

| | Group | | | |
|--|----------------|-------------|------------|-------------------|
| | Control | CDME | CSH | CDME + CSH |
| Brain cortex weight (mg) | 725 ± 61 | 719 ± 46 | 718 ± 32 | 698 ± 36 |
| Protein content (mg/g wet weight) | 52 ± 3 | 53 ± 4 | 50 ± 2 | 49 ± 4 |

Data are means ± SD for 6-8 animals in each group.

Figure 1- *In vitro* effect of cystine (CYS) on adenylate kinase activity of brain cortex from young rats.

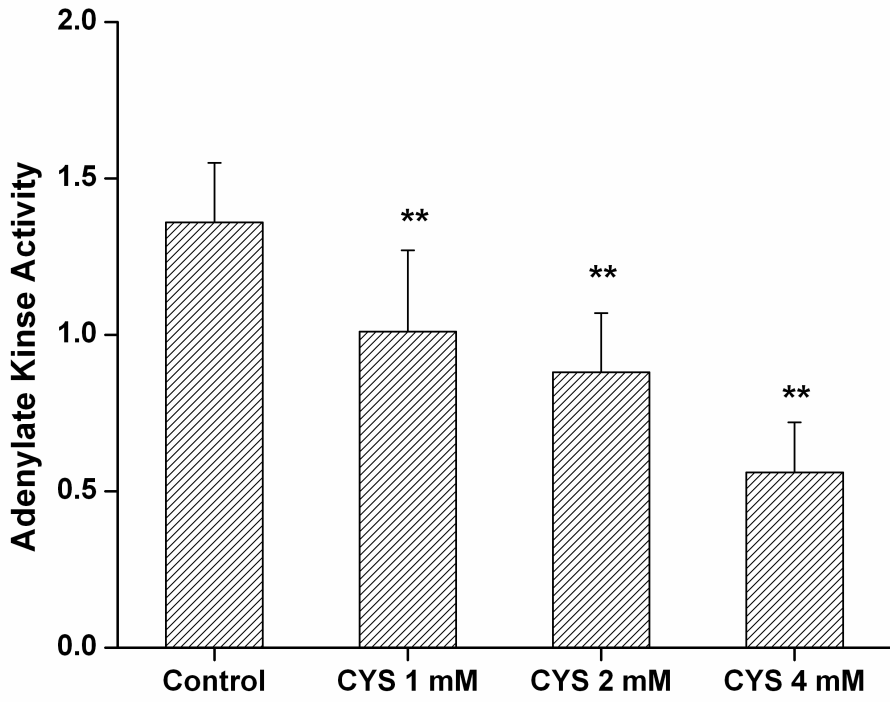
Adenylate kinase activity is expressed as μmol of ATP formed per min per mg of protein. Data are mean \pm SD for 6 animals in each group. $^{**}P < 0.01$ compared to the other groups (Tukey test).

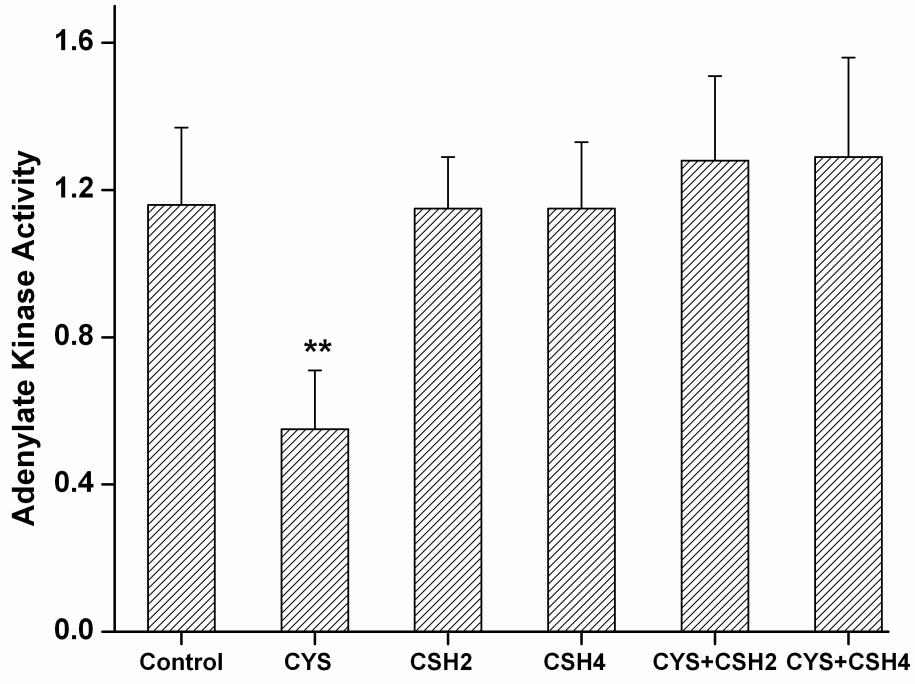
Figure 2- *In vitro* effect of cysteamine (CSH) on the inhibition caused by cystine (CYS) on adenylate kinase activity of brain cortex from young rats.

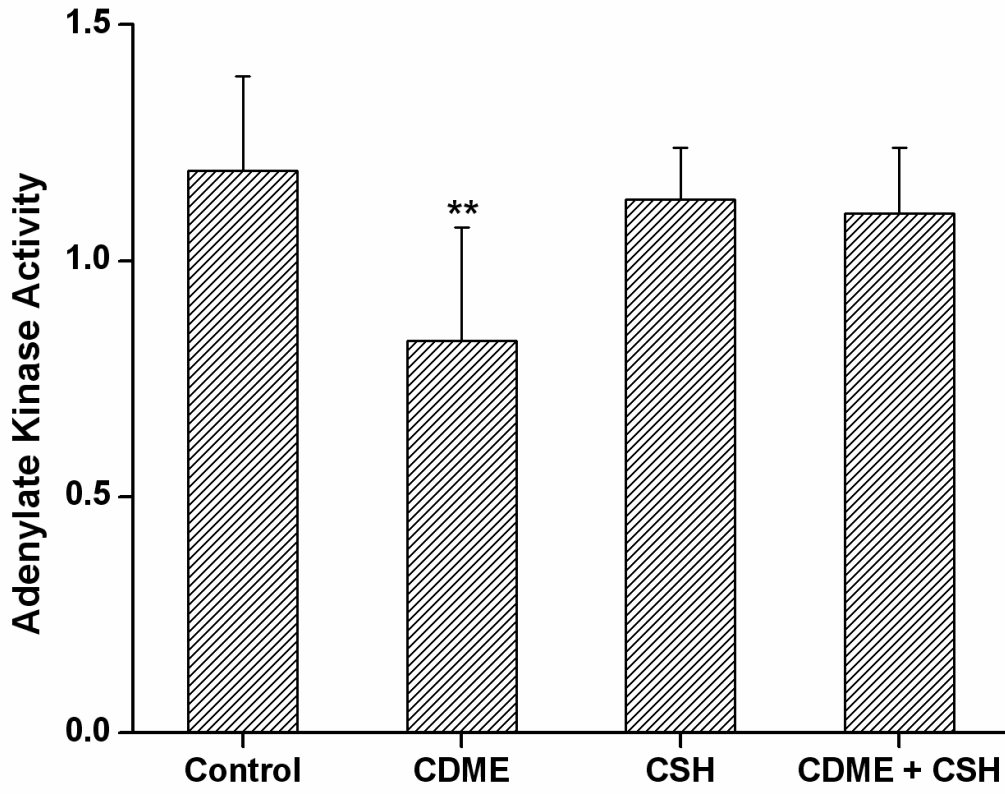
Adenylate kinase activity is expressed as μmol of ATP formed per min per mg of protein. Data are mean \pm SD for 6 animals in each group. $^{**}P < 0.01$ compared to the other groups (Tukey test).

Figure 3- Effect of cystine dimethylester (CDME) and / or cysteamine (CSH) administration on adenylate kinase activity of brain cortex from young rats.

Adenylate kinase activity is expressed as μmol of ATP formed per min per mg of protein. Data are mean \pm SD for 6-8 animals in each group. $^{**}P < 0.01$ compared to the other groups (Tukey test).







IV – Discussão

Cistinose é um erro inato do metabolismo, uma doença autossômica recessiva, caracterizado pelo acúmulo anormal de cistina em lisossomos, devido ao seu transportador, Cistinosina (codificado no gene CTNS), estar deficiente (Kalatzis e Antignac, 2003). Se não tratada pode desenvolver um dos três fenótipos diferentes: a cistinose nefropática infantil, cistinase nefropática juvenil ou a cistinose não-nefropática (Kalatzis e Antignac, 2002).

O tratamento mais comum e eficaz para cistinose é a depleção da cistina dos lisossomos. A retirada da cistina dos lisossomos se dá pelo uso de um aminotiol, a cisteamina, que reage com a cistina, formando dois produtos (cisteína e cisteína-cisteamina) que deixam a organela por outros transportadores que não o de cistina, que está comprometido na cistinose (Nesterova e Gahl, 2007). A cisteamina já se mostrou ser eficaz nessa remoção, e dessa forma minimizando os danos aos tecidos (Gahl, 2003).

Um dos possíveis efeitos tóxicos do acúmulo de cistina, seria o efeito sobre a geração de ATP mitocondrial. Em estudos com modelo de cistinose via CDME, o conteúdo de ATP é diminuído (Foreman *et al*, 1995) ou sua síntese é inibida (Coor *et al*, 1991) e o transporte ativo, como o transporte realizado pela Na^+ , K^+ -ATPase, fica comprometido (Salmon and Baum, 1990, Coor *et al*, 1991).

Porém estudos mais recentes, em células cistinóticas (ou seja, estudos que não usaram o modelo de cistinose via CDME), demonstraram que a geração mitocondrial de ATP não está comprometida (Wilmer *et al*, 2005, Laube *et al*, 2006). Dessa forma outros mecanismos estariam de fato agindo sobre a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase.

Levando em consideração que este trabalho com AK e outros do nosso grupo de pesquisa sobre a atividade da CK em modelo de cistinose (Fleck *et al*, 2005, Oliveira *et al*, 2007, Rech *et al*, 2006) demonstraram que estas enzimas, que transportam o grupamento fosforil do ATP, estão

inibidas, possivelmente a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase sem diminuição do ATP intracelular, seja, justamente, devido à falha no transporte deste ATP. Pois a simples difusão dos nucleotídeos de adenina é insuficiente para qualquer atividade intracelular que consuma energia.

A AK tem dois grupamentos tiólicos (Price *et al*, 1975) que podem ser alvos de oxidação, diminuindo a atividade desta enzima, da mesma forma como das enzimas CK e PK.

Já foi demonstrado que em células cistinóticas há uma elevação do estresse oxidativo (Levtchenko *et al*, 2005, Laube *et al*, 2006) e apoptose celular (Park *et al*, 2002, Park and Thoene, 2005, Laube *et al*, 2006, Park *et al*, 2006), sendo que a apoptose celular é mediada por cisteinilização (Thoene, 2007).

Desta forma, apesar de ainda não podermos fazer uma relação clara de causa e efeito, há dois fatores importantes atuando dentro da célula cistinótica para gerar a toxicidade pelo acúmulo de cistina: o aumento do estresse oxidativo e a inibição das enzimas da homeostasia energética intracelular e o conseqüente aumento da apoptose celular.

O acúmulo de cistina em tecidos de pacientes cistinóticos pode causar danos severos, como nos rins e no cérebro, porém o mecanismo que leva a essa toxicidade não é totalmente conhecido. Consideramos que um dos possíveis mecanismos da toxicidade da cistina, seja via seu grupamento dissulfeto, que altera a atividade das enzimas tiólicas por uma troca tiol/dissulfeto. Como as enzimas creatinaquinase, piruvatoquinase, e agora, adenilatoquinase são enzimas tiólicas cruciais para a homeostasia energética (PK na rota glicolítica e CK e AK na rede de transferência de fosfato), suas inibições, por acúmulo de cistina, podem causar um desequilíbrio energético intracelular. Somando estes fatores, e sabendo que o acúmulo de cistina também pode resultar em apoptose, o desequilíbrio no transporte intracelular de ATP pode ser um dos possíveis mecanismos da toxicidade da cistina, e sua prevenção pela cisteamina um possível novo efeito benéfico da tratamento com este aminotiol.

V – Conclusões

A cistina inibiu a atividade da adenilatoquinase *in vitro* de modo dependente da concentração.

A cisteamina não teve efeito sobre a atividade da adenilatoquinase *in vitro*, mas preveniu a inibição causada pela cistina.

A administração de CDME *in vivo* diminuiu a atividade da adenilatoquinase e a administração de cisteamina preveniu a diminuição da atividade da enzima.

Conclusão Geral

A cistina inibe enzimas tiólicas adenilatoquinase, creatinaquinase e piruvatoquinase, *in vitro* e *in vivo*, o que pode ocasionar comprometimento do metabolismo energético das células afetadas. A cisteamina, um aminotiol administrado a pacientes cistinóticos por ser um depletante dos cristais de cistina, previne a inibição sobre as enzimas tiólicas. Caso esse mecanismo, demonstrado em modelo experimental de sobrecarga de CDME, se confirme em pacientes com cistinose, a inibição da rede de transferência de fosfato (creatinaquinase, e adenilatoquinase) pode explicar porque a síntese de ATP em células cistinóticas esteja normal, mas a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase esteja comprometida, podendo ser um importante mecanismo envolvido na patologia da cistinose.

VI– Perspectivas

Este trabalho abre oportunidades de duas formas independentes: uma em relação a sua contribuição para as ciências, e outra especificamente para o grupo de pesquisa na qual esse trabalho está inserido. Neste caso, o protocolo de mensuração da atividade da adenilatoquinase foi somado aos protocolos de outras enzimas associadas aos erros inatos do metabolismo já estudados em nosso grupo de pesquisa. Desta forma, somar a atividade da adenilatoquinase a creatinaquinase, contempla-se toda rede de transferência de fosfato da célula ou tecido em questão. Recentemente, nosso laboratório determinou a atividade da Adenilatoquinase juntamente com a Piruvatoquinase e Creatinaquinase em rins de ratos sob mesmo modelo experimental de CDME (artigo submetido).

Em relação à ciência, este trabalho abre perspectivas para futuros estudos da adenilatoquinase e a rede de transferência de fosfato em células cistinóticas, como fibroblastos de pacientes afetados por cistinose, tratados ou não com cisteamina.

VII - Referências Bibliográficas Adicionais

Anikster, Y., Shotelersuk, V., and Gahl, W.A. CTNS mutations in patients with cystinosis. *Hum Mutat* 14:454-458, 1999.

Bae, E. and Philips, G.N. Roles of static and dynamic domains in stability and catalysis of adenylate kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(7):2132-7. 2006.

Beadle G.W. and Tatum E.L. Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 15;27(11):499-506. 1941.

Belldina, E.B., Huang, M.Y., Schneider, J.A., Brundage, R.C., Tracy, T.S. Steady-state pharmacokinetics and pharmacodynamics of cysteamine bitartrate in paediatric nephropathic cystinosis patients. *Br J Clin Pharmacol*; 56(5):520-5. 2003.

Bendel-Stenzel, M.R., Steinke, J., Dohil, R., and Kim, Y. Intravenous delivery of cysteamine for the treatment of cystinosis: association with hepatotoxicity. *Pediatr Nephrol.* 23:311–315. 2008.

Callaghan, O.H, and Weber, G. Kinetic Studies on Rabbit-Muscle Myokinase. *Biochem J.* 73:473-85; 1959.

Carrasco, A.J., Dzeja. P.P., Alekseev, A.E., Pucar, D., Zingman, L.V., Abraham, M.R., Hodgson, D., Bienengraeber, M., Puceat, M., Janssen, E., Wieringa, B., Terzic, A. Adenylate kinase phosphotransfer communicates cellular energetic signals to ATP-sensitive potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U SA.* ;98(13):7623-8; 2001.

Colowick, S.P and Kalckar, H.M. The Role of Myokinase in Transphosphorylations I. The Enzymatic Phosphorylation of Hexoses by Adenyl Pyrophosphate. *J Biol Chem.* 148: 117-126; 1943.

Dohil, R., Newbury, R.O., Sellers, Z.M., Deutsch, R., Schneider, J.A. The evaluation and treatment of gastrointestinal disease in children with cystinosis receiving cysteamine. *J Pediatr.* 143(2):224-30. 2003.

Dronamraju, K. Profiles in Genetics: Archibald E. Garrod (1857-1936). *Am. J. Hum. Genet.* 51:216-219, 1992.

Dzeja, P.P., Zeleznikar, R.J. and Goldberg, N.D. Suppression of Creatine Kinase-catalyzed Phosphotransfer Results in Increased Phosphoryl Transfer by Adenylate Kinase in Intact Skeletal Muscle. *J Biol Chem.* 271(22):12847-51; 1996.

El Husny, A.S. e Fernandes-Caldato, M.C. Erros Inatos do Metabolismo: Revisão de Literatura. *Revista Paraense de Medicina.* 20: 41-45. 2006.

Furter, R., Furter-Graves, E.M., Wallimann, T. Creatine Kinase: The Reactive Cysteine Is Required for Synergism But Is Nonessential for Catalysis. *Biochemistry.* 32, 7022-7029. 1993.

Gahl, W.A., Balog, J.Z., and Kleta, R. Nephropathic Cystinosis in Adults: Natural History and Effects of Oral Cysteamine Therapy. *Ann Intern Med.* 147:242-250. 2007.

Garrod, A.E. The lessons of rare maladies. *Lancet* 1:1055, 1928.

Garrod, A.E. Inborn Errors of Metabolism. 1923; Available at: <http://www.esp.org/books/garrod/inborn-errors/facsimile/> . Acessado em 5 de abril de 2008.

Gerstei, M., Schulz, G. And Chothia, C. Domain closure in adenylate kinase. Joints on either side of two helices close like neighboring fingers. *J Mol Biol.*229(2):494-501. 1993.

Hornemann, T., Rutishauser, D., Wallimann, T. Why is creatine kinase a dimer? Evidence for cooperativity between the two subunits. *Biochim Biophys Acta.* 1480(1-2):365-73. 2000.

Iwata, F., Kuehl, E.M., Reed, G.F., McCain, L.M., Gahl, W.A., and Kaiser-Kupfer, M.I. A Randomized Clinical Trial of Topical Cysteamine Disulfide (Cystamine) versus Free Thiol (Cysteamine) in the Treatment of Corneal Cystine Crystals in Cystinosis. *Mol Genet Metab* 64,

237–242. 1998.

Kalatzis, V., and Antignac, C. New aspects of the pathogenesis of cystinosis. *Pediatr Nephrol.* 18:207–215. 2003.

Kalatzis, V., and Antignac, C. Cystinosis: from gene to disease. *Nephrol Dial Transplant* 17: 1883–1886. 2002

Kalatzis, V., Nevo, N., Cherqui, S., Gasnier, B., and Antignac, C. Molecular pathogenesis of cystinosis: effect of CTNS mutations on the transport activity and, subcellular localization of cystinosin. *Hum Mol Genet.* 13(13):1361-71. 2004.

Kalatzis V., Cherqui S., Antignac C., and Gasnier B. Cystinosin, the protein defective in cystinosis, is a H(+)-driven lysosomal cystine transporter. *EMBO J.* ;20(21):5940-9. 2001a.

Kalatzis, V., Cherqui, S., Jean, G., Cordier, B., Cochat, P., Broyer, M., and Antignac, C. Characterization of a Putative Founder Mutation that Accounts for the High Incidence of Cystinosis in Brittany. *J Am Soc Nephrol* 12: 2170–2174, 2001b.

Kalckar, H.M. The Role of Myokinase in Transphosphorylations. II. The Enzymatic Action of Myokinase on Adenine Nucleotides. *J Biol Chem.* 148: 127-137; 1943.

Kiehntopf, M., Schickel, J., von der Gönne, B., Koch, H.G., Superti-Furga, A., Steinmann, B., Deufel, T., and Harms, E. Analysis of the CTNS Gene in Patients of German and Swiss Origin with Nephropathic Cystinosis. *Hum Mutat.* 20(3):237, 2002.

Kleta, R. and Gahl, W.A. Cystinosis: Antibodies and Healthy Bodies. *J Am Soc Nephrol* 13: 2189–2191, 2002.

Levtchenko, E.N., van Dael, C.M., de Graaf-Hess, A.C., Wilmer, M.J., van den Heuvel, L.P., Monnens, L.A., Blom, H.J. Strict cysteamine dose regimen is required to prevent nocturnal cystine accumulation in cystinosis. *Pediatr Nephrol.* 21(1):110-3; 2006b.

Levtchenko, E., de Graaf-Hess, A., Wilmer, M., van den Heuvel, L., Monnens, L., Blom, H. Altered

status of glutathione and its metabolites in cystinotic cells. *Nephrol Dial Transplant*. 20(9):1828-32. 2005.

Ma, B., Kumar, S., Tsai, C., Wolfson, H., Sinha, N., and Nussinov, R. Protein--Ligand interactions: Induced fit. In Robertson, S. (Ed.): *Encyclopedia of Life Sciences*, London, Macmillan Reference Limited. 2001.

Mancini, G.M.S., Havelaar, A.C., and Verheijen, F.W. Lysosomal transport disorders. *J. Inherit. Metab. Dis.* 23; 278-292. 2000.

Manzl, F., and Gretz, N. Progression of chronic renal failure in a historical group of patients with nephropathic cystinosis. *European Collaborative Study on Cystinosis. Pediatr Nephrol* 8:466-471. 1994.

Markello, T.C., Bernadini, I.M., Gahl, W.A.. Improved renal function in children with cystinosis treated with cysteamine. *N Engl J Med*; 328: 1157–1162. 1993.

Martins, A.M. Inborn errors of metabolism: a clinical overview. *Rev Paul Med*; 117(6):251-65. 1999.

McDowell, G.A., Town, M.M., van't Hoff, W., Gahl, W.A. Clinical and molecular aspects of nephropathic cystinosis. *J Mol Med* 76:295–302. 1998.

Muller, C.W, Schlauderer, G.J, Reinstein, J. And Schulz, G.E. Adenylate kinase motions during catalysis: an energetic counterweight balancing substrate binding. *Structure*; 4(2):147-56; 1996.

Nesterova, G., and Gahl, W.A.. Nephropathic cystinosis: late complications of a multisystemic disease. *Pediatr Nephrol*. 2007.

Noma, T. Dynamics of nucleotide metabolism as a supporter of life phenomena. *J Med Invest*. 52(3-4):127-36. 2005.

Park, M., Helip-wooley, A., and Thoene, J. Lysosomal Cystine Storage Augments Apoptosis in Cultured Human Fibroblasts and Renal Tubular Epithelial Cells. *J Am Soc Nephrol* 13: 2878–2887,

2002.

Park, M.A., Pejovic, V., Kerisit, K.G., Junius, S., and Thoene, J.G. Increased Apoptosis in Cystinotic Fibroblasts and Renal Proximal Tubule Epithelial Cells Results from Cysteinylation of Protein Kinase C. *J Am Soc Nephrol* 17: 3167–3175, 2006.

Pucar, D., Bast, P., Gumina, R.J., Lim, L., Drahl, C., Juranic, N., Macura, S., Janssen, E., Wieringa, B., Terzic, A., Dzeja, P.P. Adenylate kinase AK1 knockout heart: energetics and functional performance under ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*;283(2):H776-82; 2002.

Pucar, D., Dzeja, P.P., Bast, P., Juranic, N., Macura, S., Terzic, A.. Cellular Energetics in the Preconditioned State. *J Biol Chem.* 276(48):44812-9. 2001.

Raghuveer, T.S., Garg, U. and Graf, W.D. Inborn Errors of Metabolism in Infancy and Early Childhood: An Update. *Am Fam Physician.* 1;73(11):1981-90. 2006.

Rech, V.C., Athaydes, G.A., Feksa, L.R., Dornelles, P.K., Rodrigues-Junior, V., Dutra-Filho, C.S., De Souza Wyse. A.T., Wajner, M., Wannmacher, C.M. Inhibition of creatine kinase activity by cystine in the kidney of young rats. *Pediatr Res.* 60(2):190-5. 2006.

Roth, K.S, and Chan, J.C.M. Cystinosis and Cystinuria: Differences in outcomes. *Saudi J Kidney Dis Transplant.* 14(1):351-257. 2003.

Savabi, F. 11-6 Interaction of creatine kinase and adenylate kinase systems in muscle cells. *Mol Cell Biochem.* 133-134:145-52. 1994.

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

Sear, R.P. Solution stability and variability in a simple model of globular proteins. *J Chem Phys.* 120(2):998-1005. 2004.

Shapiro, Y.E., Kahana, E., Tugarinov, V., Liang, Z., Freed, J.H., Meirovitch, E. Domain Flexibility in Ligand-Free and Inhibitor-Bound *Escherichia coli* Adenylate Kinase Based on a Mode-Coupling

Analysis of ¹⁵N Spin Relaxation. *Biochemistry*, 41, 6271-6281. 2002.

Shotelersuk, V., Larson, D., Anikster, Y., McDowell, G., Lemons, R., Bernardini, I., Guo, J., Thoene, J.T., and Gahl, W.A. CTNS Mutations in an American-Based Population of Cystinosis Patients. *Am. J. Hum. Genet.* 63:1352–1362, 1998.

Stachowiak, O., Schlattner, U., Dolder, M., Wallimann, T. Oligomeric state and membrane binding behaviour of creatine kinase isoenzymes: implications for cellular function and mitochondrial structure. *Mol Cell Biochem.* 184(1-2):141-51. 1998.

Thoene, J.G. A review of the role of enhanced apoptosis in the pathophysiology of cystinosis. *Mol Genet and Metab*; 92:292–298. 2007.

Thoene, J.G., Oshima, R.G., Crawhall, J.C., Olson, D.L., Schneider, J.A. Cystinosis. Intracellular cystine depletion by aminothiols *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Invest.* 58: 180–9. 1976.

Tsilou E.T., Rubin B.I., Reed G., Caruso R.C., Iwata F., Balog J., Gahl W.A., Kaiser-Kupfer M.I. Nephropathic cystinosis: posterior segment manifestations and effects of cysteamine therapy. *Ophthalmology*;113(6):1002-9; 2006.

Tsilou, E., Zhou, M., Gahl, W., Sieving, P.C., Chan, C.C. Ophthalmic manifestations and histopathology of infantile nephropathic cystinosis: report of a case and review of the literature. *Surv Ophthalmol.*;52(1):97-105. 2007.

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

Willis, R. The works of William Harvey, M.D. London: Sydenham; pp. 616-617, 1847.