

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Bioquímica
Programa de Pós - Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica**

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE HISTIDINA A RATAS WISTAR
DURANTE A GRAVIDEZ E A LACTAÇÃO SOBRE ENZIMAS DO
METABOLISMO ENERGÉTICO EM CÓRTEX CEREBRAL E HIPOCAMPO
DA PROLE**

Denise Bertin Rojas

Orientador: Prof. Dr. Clovis Milton Duval Wannmacher

Porto Alegre, 2012.

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Bioquímica
Programa de Pós - Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica**

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE HISTIDINA A RATAS WISTAR
DURANTE A GRAVIDEZ E A LACTAÇÃO SOBRE ENZIMAS DO
METABOLISMO ENERGÉTICO EM CÓRTEX CEREBRAL E HIPOCAMPO
DA PROLE**

Denise Bertin Rojas

Orientador: Prof. Dr. Clovis Milton Duval Wannmacher

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Daniel Pens Gelain (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)
Prof.(a) Dr.(a) Claudia da Silva Funchal (Centro Metodista IPA)
Prof.(a) Dr.(a) Vera Treis Trindade (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Porto Alegre, 2012.

“Sei que o meu trabalho é uma gota no oceano, mas sem ele, o oceano seria menor”

Madre Teresa de Calcutá.

Aos meus pais, Hélia e Félix, pela minha vida, pelo incentivo, pela presença constante e

toda forma de apoio até aqui;

À minha amada vó, por ser mais que um anjo em minha vida;

A Deus, por ser o meu refúgio e a minha fortaleza!

Agradecimentos

À UFRGS e ao Departamento de Bioquímica pela estrutura que nos oferecem para realização de nossos projetos, aos funcionários pela dedicação, aos professores pelo exemplo. Aos colegas do Departamento pelos conhecimentos compartilhados e amizades. Ao meu orientador, professor Clovis, pelos valiosos ensinamentos, pelo auxílio fundamental a cada passo que dou, por ter incentivado tantas mudanças em mim. Aos professores, Ângela, Dutra, Moacir e colegas dos laboratórios de Erros Inatos do Metabolismo, pela ajuda e pelas amizades. Aos colegas do laboratório 34, pelo companheirismo e pelo auxílio neste trabalho. Tanise e Rodrigo por estarem ao meu lado em tantos momentos, por todo apoio ao longo desses 2 anos. Aos amigos de “casa”, da faculdade, dos locais de trabalho, pela compreensão, pelo carinho, incentivo, sinto não poder citá-los um a um! À minha família, pelo amor que superou algumas dificuldades, pela alegria, pela constante torcida. Paulinha e tia Inez, impossível não dizer o quanto são especiais. Meus irmãos amados, William e Henrique, por dividirmos tantas alegrias, tanta fé e coragem. Aos meus avós, não há como traduzir em palavras o orgulho que tenho de vocês, a gratidão por tanto amor, e a saudade que sinto de minha vó, minha maior fã. Mãe e pai, basta dizer que vocês são TUDO?! Obrigada por abdicarem dos seus planos para que eu e meus irmãos realizemos os nossos sonhos, obrigada por permitirem, por incentivarem os meus projetos. Obrigada pelos valores que foram semeados no dia-a-dia, de bondade, de amor, de respeito, de humildade. Mãezinha, obrigada por me deixar chorar no teu colo e sempre me oferecer um sorriso em troca, eu sempre entendi! Deus Pai, obrigada pela minha vida e pelo mundo que me acerca!

SUMÁRIO

Resumo	VII
Abstract	VIII
Lista de abreviaturas	IX
Lista de figuras	X
1. Introdução	1
1.1. Erros Inatos do Metabolismo de Aminoácidos.....	1
1.2. Histidinemia.....	2
1.3. Histidinemia Materna.....	4
1.4. Histidina.....	5
1.5. Creatinaquinase.....	6
1.6. Piruvatoquinase.....	9
1.7. Adenilatoquinase.....	10
2. Objetivos	12
2.1. Objetivos gerais.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. Resultados	13
4. Discussão	45
5. Conclusão	51
6. Perspectivas	52
7. Referências bibliográficas adicionais	53

Resumo

A histidinemia é um erro inato do metabolismo de aminoácidos causado pela deficiência na atividade da enzima histidase no fígado e na pele, levando ao acúmulo de histidina no plasma e nos tecidos. É uma doença de caráter autossômico recessivo usualmente considerada inofensiva aos pacientes e a seus filhos; entretanto, alguns pacientes e crianças nascidas de mães histidinêmicas apresentam leves alterações neurológicas. Considerando que a histidinemia é uma das mais frequentes doenças metabólicas, no presente estudo nós investigamos o efeito da sobrecarga de L-histidina a ratas fêmeas durante a gestação e a lactação em alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral e hipocampo da prole. As atividades da piruvatoquinase e da creatinaquinase citosólica e mitocondrial diminuíram em córtex cerebral e hipocampo dos ratos da prole aos 21 dias de idade e esse padrão permaneceu em ambas as estruturas aos 60 dias de idade. Além disso, a atividade da adenilatoquinase foi reduzida em córtex e hipocampo da prole aos 21 dias, enquanto a atividade aumentou nos dois tecidos aos 60 dias de vida. Estes resultados sugerem que a administração de L-histidina às ratas fêmeas no curso da gravidez e da amamentação prejudica a homeostasia energética em córtex cerebral e hipocampo dos ratos nascidos de mães tratadas. Considerando que a histidinemia é geralmente uma condição benigna e que pouca atenção tem sido dada à histidinemia materna, parece importante que mais estudos sejam realizados em crianças nascidas de mães histidinêmicas.

Abstract

Histidinemia is an inborn error of metabolism of amino acids caused by deficiency of histidase activity in liver and skin with consequent accumulation of histidine in plasma and tissues. Histidinemia is an autosomal recessive trait usually considered harmless to patients and their offspring, but some patients and children born from histidinemic mothers have mild neurologic alterations. Considering that histidinemia is one of the most frequently identified metabolic conditions, in the present study we investigated the effect of L-histidine load to female rats during pregnancy and lactation on some parameters of energy metabolism in cerebral cortex and hippocampus of the offspring. Pyruvate kinase, cytosolic and mitochondrial creatine kinase activities decreased in cerebral cortex and in hippocampus of rats at 21 days of age and this pattern remained in the cerebral cortex and in hippocampus at 60 days of age. Moreover, adenylate kinase activity was reduced in the cerebral cortex and in hippocampus of the offspring at 21 days of age, whereas the activity was increased in the two tissues at 60 days of age. These results suggest that administration of L-histidine to female rats in the course of pregnancy and lactation impaired energy homeostasis in the cerebral cortex and hippocampus of the offspring. Considering that histidinemia is usually a benign condition and little attention has been given to maternal histidinemia, it seems important to perform more studies in the children born from histidinemic mothers.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: adenosina difosfato

AK: adenilatoquinase

AMP: adenosina monofosfato

ATP: adenosina trifosfato

CK: creatinaquinase

Cr: creatina

EIM: erros inatos do metabolismo

FBP: frutose -1,6- bifosfato

GDP: guanosina difosfato

GTP: guanosina trifosfato

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

PCr: fosfocreatina

PEP: fosfoenolpiruvato

PK: piruvatoquinase

SNC: sistema nervoso central

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Metabolismo da L-histidina.

Figura 2 – Reação catalisada pela creatinaquinase.

Figura 3 – Modelo do sistema CK/PCR em tecidos com alta demanda energética.

Figura 4 – Reação catalisada pela piruvatoquinase.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Erros inatos do metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) englobam um grupo de doenças hereditárias causadas pela deficiência total ou parcial de uma proteína, que é geralmente uma enzima. A deficiência na atividade desta enzima pode levar ao bloqueio da rota metabólica da enzima em questão, com conseqüente acúmulo de substratos ou de seus metabólitos e a falta dos produtos sintetizados por essa via, causando em muitos indivíduos prejuízo no desenvolvimento físico e/ou mental. O termo EIM foi pioneiramente descrito pelo médico inglês Archibald Garrod em 1908, em referência a quatro doenças que ele observou nos pacientes: alcaptonúria, cistisúria, pentosúria e albinismo. Garrod observou que tais doenças ocorriam em vários membros de uma mesma família e que os casos eram mais frequentes tratando-se de filhos de pais consanguíneos sendo que estes não apresentavam a doença. Com base nas leis de Mendel, o conjunto de observações permitiu a ele propor um modelo de herança autossômica recessiva (Scriver et al., 2001).

De modo individual os EIM são raros, porém, quando considerados em conjunto têm uma frequência relativamente alta, em torno de um a cada mil nascidos vivos (Scriver et al., 2001). Quanto às manifestações clínicas, elas podem ser variadas e inespecíficas nos diferentes pacientes conforme a área do metabolismo e tecido afetados. Pode haver desde casos assintomáticos até tão graves que causem a morte neonatal ou sérios prejuízos ao sistema nervoso central (SNC) (Benson e Fenson, 1985, Burton et al., 1987). Atualmente mais de 500 EIM são conhecidos e diferentes classificações têm sido propostas. Uma delas é de acordo com a área do metabolismo atingida: EIM de ácidos orgânicos, lipídeos, glicídeos, glicosaminoglicanos,

aminoácidos, etc. (Scriver et al. 2001). Nosso trabalho teve por base a histidinemia, um EIM de aminoácidos.

1.2. Histidinemia

A histidinemia é um erro inato do metabolismo de aminoácidos de caráter autossômico recessivo, causado pela deficiência na atividade da enzima histidase (histidina amônia-liase, E.C.4.3.1.3) presente na pele (La Du et al., 1962) e no fígado (Auerbach et al., 1967). Essa enzima é responsável pela maior parte do catabolismo da histidina, catalisando a desaminação não oxidativa da L-histidina a ácido urocânico (Figura 1). Na sequência de reações, o produto final dessa via é o ácido glutâmico (Taylor et al., 1991). As consequências bioquímicas são um aumento nas concentrações de histidina no sangue, urina e fluido cérebro-espinhal, diminuição de ácido urocânico no sangue e na pele e aumento da excreção urinária de metabólitos da histidina (Levy et al., 2001). Os níveis de histidina encontrados no sangue de pacientes histidinêmicos variam entre 290 e 1420 μM , sendo que as taxas normais encontram-se na faixa de 70 a 120 μM (Levy et al., 1974).

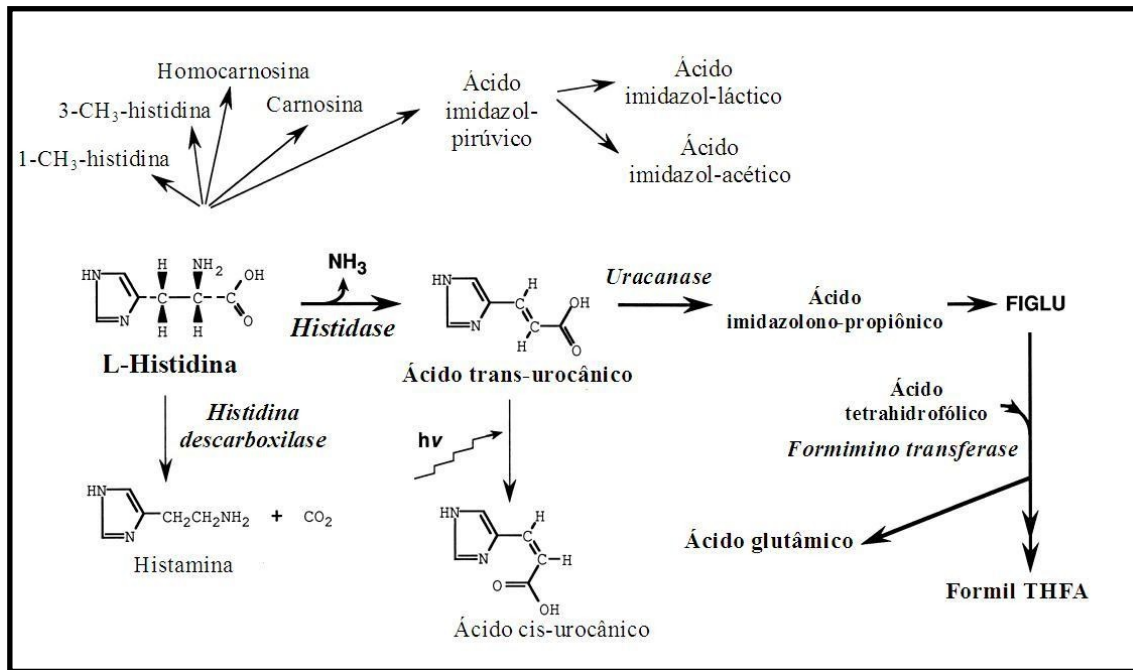


Figura 1: metabolismo da L-histidina (adaptado de Taylor et al., 1991).

A doença foi descrita pela primeira vez em 1961 por Ghadimi et al. em duas irmãs pela observação de níveis elevados de histidina no plasma e na urina. Os primeiros casos relatados da doença documentam, como principais manifestações clínicas, retardo mental e distúrbios de linguagem (La Du, 1978). No entanto, o acompanhamento de crianças histidinêmicas detectadas por screening neonatal mostrou que a maioria delas apresentava desenvolvimento normal (Tada et al., 1982; Coulombe et al., 1983; Lam et al., 1996). Com base nos estudos previamente realizados, a histidinemia parece ser benigna, porém, sob certas condições, ainda não esclarecidas, ela parece ser prejudicial ao sistema nervoso central em aproximadamente 1% dos pacientes (Levy et al., 2001). Acredita-se que diferentes mecanismos genéticos sejam responsáveis pelo dano neurológico (Taylor et al., 1991) e que os sintomas possam ser heterogêneos devido a diferentes mutações alélicas. De encontro a este último parecer, um estudo acompanhou todo o desenvolvimento de 50 pacientes com níveis anormais de histidina no sangue e análises psiquiátricas apontaram que a histidinemia é um fator

de risco para o desenvolvimento de desordens do comportamento em indivíduos sob circunstâncias específicas, como eventos perinatais anormais (Ishikawa,1987; Kawai et al., 2005).

Uma das formas de tratamento para os EIM de aminoácidos é limitar a entrada do precursor da via metabólica afetada (por exemplo: fenilalanina na fenilcetonúria). Na histidinemia, entretanto, na maioria dos casos não existem evidências que mostrem melhora na sintomatologia clínica dos pacientes histidinêmicos quando submetidos a uma dieta restrita em histidina (Virmani e Widhalm, 1993).

1.3. Histidinemia materna

O interesse pelo estudo da histidinemia materna surgiu a partir do conhecimento de que a fenilcetonúria materna compromete o desenvolvimento físico e mental dos fetos (Vargas e Levy, 1998). Outro fator que impulsionou a pesquisa nesta área é a observação de que um grande número de pacientes com algum tipo de erro inato do metabolismo chega à idade adulta, sendo capazes de tornarem-se pais. No entanto, os possíveis riscos a que essas crianças estarão submetidas é desconhecido na maioria das doenças, uma vez que pouco se conhece sobre os riscos associados à gravidez nesses casos (Radomyska, 2003). Neste contexto cabe salientar que a incidência da histidinemia detectada por programas de triagem neonatal foi alta em algumas populações, sendo cerca de um para 12.000 nascidos, podendo chegar a 1:9600 no Japão (Levy et al., 2001), tornando, portanto, relevante a investigação dos efeitos da histidinemia materna sobre as crianças geradas sob essa condição. Por serem consideradas situações geralmente benignas, tem havido pouco interesse em acompanhar os filhos de mães histidinêmicas. O acompanhamento de 25 gestações de 10 mães histidinêmicas mostrou que problemas como déficit de atenção e necessidade

de educação especial por certos períodos não foram significativamente diferentes do que o esperado para a população em geral (Levy et al., 2004). Outros estudos reportados também não detectaram efeitos adversos da desordem metabólica materna no desenvolvimento físico e intelectual das crianças, neste exemplo, foram 5 filhos estudados (Neville et al., 1971, Armstrong, 1975). Porém, há um caso de uma família na qual 4 crianças tiveram avaliação de QI abaixo da de seus pais, sendo a mãe histidinêmica (Lyon et al., 1974). Por outro lado, em trabalhos realizados com animais deficientes de histidase parece haver prejuízo do desenvolvimento. Kacser e colegas demonstraram que a histidinemia materna em camundongos provoca anormalidades no ouvido interno, provavelmente causada por alterações do tubo neural, além de defeitos no equilíbrio da prole (Kacser et al., 1977; 1979). Da mesma forma que a incerteza da benignidade da histidinemia, quanto à histidinemia materna esta dúvida também permanece, pois, como mencionado, há casos em que foram observadas alterações cognitivas no desenvolvimento de filhos de mães histidinêmicas. Entretanto esta não parece ser uma regra, mostrando que vários fatores estão envolvidos nos mecanismos patogênicos da doença.

1.4. Histidina

A histidina é um aminoácido considerado essencial na infância, tendo a sua retirada total da dieta resultado em taxa reduzida de ganho de peso e retenção de nitrogênio (Snyderman et al., 1963). Em crianças mais velhas e em adultos, o efeito de uma dieta restrita em histidina por longos períodos ainda é incerto. No entanto, estudos apontam que mesmo havendo biossíntese do aminoácido ela parece ser insuficiente durante as fases de crescimento ou suporte para situações de estresse fisiológico (Stifel e Herman, 1972).

Além de seu papel para o crescimento, existem outros aspectos relevantes relativos à histidina, e alguns trabalhos têm demonstrado mecanismos pelos quais ela interage com o ambiente celular. Propriedades pró-oxidantes (Oya e Yamamoto, 1988; Erickson and Hultin, 1992; Cantoni et al., 1994b; Tansini et al., 2004) em contraste a efeitos antioxidantes (Kukreja et al., 1993; Obata e Yamanaka, 2000; Obata et al., 2001) foram observados. As concentrações consideradas antioxidantes nos trabalhos citados são de 25 mM ou acima, sendo que isso é cerca 10 vezes maior do que as concentrações encontradas nos pacientes histidinêmicos (Levy et al., 1974).

1.5. Creatinaquinase

A creatinaquinase (CK; EC 2.7.3.2) exerce um papel chave no metabolismo energético celular de tecidos que possuem alta e flutuante demanda de energia, como músculo esquelético, cardíaco e cérebro. Ela catalisa a transferência reversível de um grupo N-fosforil da fosfocreatina (PCr) para a adenosina difosfato (ADP), formando adenosina trifosfato (ATP) e creatina (Cr) em uma reação dependente de magnésio (Figura 2) (Wallimann et al., 1992).

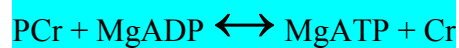


Figura 2: Reação catalisada pela creatinaquinase.

São conhecidas cinco isoenzimas da creatinaquinase, as quais estão compartimentalizadas especificamente. Dois tipos de subunidades compõem as três isoformas citosólicas, a M-CK e a B-CK (M de “muscle”, B de “brain”) (Wallimann et al., 1992). Essas subunidades se combinam in vivo, formando as isoenzimas citosólicas diméricas MM-, BB-CK e MB. A isoenzima MM-CK é encontrada predominantemente no músculo esquelético, a BB-CK no cérebro e a MB-CK no músculo cardíaco

(Eppenberger et al., 1967). Há também duas isoformas mitocondriais encontradas no espaço intermembranas, a forma Mi-CK ubíqua (Mi_a -CK) expressa predominantemente no cérebro, e a forma Mi-CK sarcomérica (Mi_b -CK) no músculo estriado. Ambas formam homodímeros ou homooctâmeros, sendo a última a forma oligomérica predominante in vivo (Wallimann et al., 2011).

Geralmente as isoenzimas citosólica e mitocondrial são co-expressas em tecidos específicos dentro de compartimentos subcelulares onde a energia liberada é captada (glicólise e mitocôndria) ou utilizada (ATPases e quinases no citosol) sendo ligadas funcional ou estruturalmente pelo circuito de PCr (Figura 3) (Wallimann et al., 1992). Assim, esse sistema de ligação das diferentes isoenzimas de CK com ATP/ADP, Cr/PCr permite a distribuição intracelular de energia, confirmando seu papel chave no metabolismo energético.

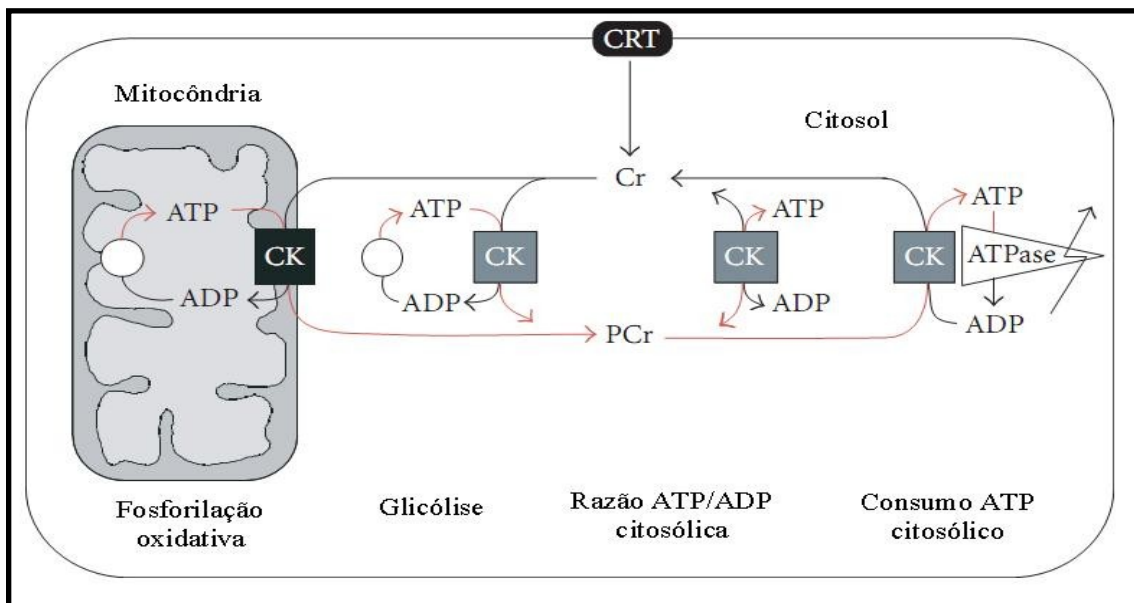


Figura 3: Modelo do sistema CK/PCr em tecidos com alta demanda energética (Adaptado de

Bürklen et al., 2006).

Várias funções têm sido atribuídas ao sistema CK/PCr. Duas dessas principais funções são chamadas de tamponamento energético temporal e espacial. O tamponamento temporal refere-se ao processo de entrada da creatina na célula passando pela ação das diferentes creatinaquinasas microcompartimentalizadas no citosol ou no espaço intermembrana mitocondrial. Desse modo, temos CK próximas aos microambientes de consumo de ATP a partir do *pool* de PCr e aos de geração de PCr que são os sítios glicolíticos e de fosforilação oxidativa (Schalattner et al., 2006). O tamponamento espacial é também chamado de sistema de transporte de energia, pois traz o conceito de que a PCr serviria como o transportador de energia, conectando sítios de liberação e captação a sítios de consumo de energia por meio das isoformas de CK compartimentalizadas (Wallimann et al., 1992; Wallimann et al., 2011). O sistema CK/PCr impede que haja uma queda acentuada nos níveis de ATP durante o trabalho celular, buscando manter a razão ATP/ADP elevada nos sítios subcelulares onde a CK está ligada a processos ou enzimas que consomem ATP, como por exemplo, as bombas de íons (Wallimann, 1994). Ao mesmo tempo a creatinaquinase utiliza H^+ na regeneração do ATP, evitando uma acidificação intracelular causada pelo gasto de ATP (Wallimann et al., 1992).

O cérebro possui uma alta demanda energética e o sistema da creatinaquinase exerce uma grande contribuição na manutenção dos níveis de ATP. Portanto, condições que levem a alterações no seu funcionamento podem estar envolvidas na via de neurodegeneração com conseqüente perda neuronal (Tomimoto et al., 1993). Nesse contexto, autores têm mostrado que a diminuição da atividade da CK pode ser um dos indicadores de dano celular em doenças como Alzheimer (Aksenov et al., 1997) enquanto outros trabalhos mostram que alguns aminoácidos acumulados em erros inatos

do metabolismo provocam alteração energética cerebral (Kessler et al., 2003; Rech et al., 2008; Tonin et al., 2009).

1.6. Piruvatoquinase

A reação de transferência de um grupamento fosforil do fosfoenolpiruvato (PEP) para o ADP formando piruvato e ATP (Figura 4) é a última etapa da via glicolítica e é catalisada pela ação da enzima piruvatoquinase (PK, ATP: piruvato 2-O-fosfotransferase, EC 2.7.1.40), sendo esta uma das enzimas reguladoras dessa via (Valentini et al., 2000). A glicólise é uma via fundamental para manutenção da homeostasia e do funcionamento celular, estando presente em todos os tipos celulares, e, especialmente no cérebro, esse processo é essencial uma vez que a glicose é o seu principal metabólito energético (Sokoloff, 1993; Erecińska e Silver, 1994).

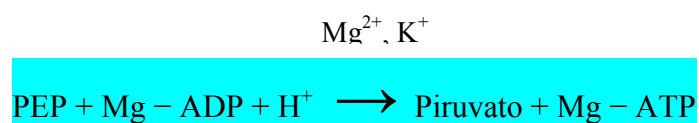


Figura 4: Reação catalítica da piruvatoquinase.

São conhecidas quatro isoenzimas (L, R, M₁ e M₂) da PK expressas em diferentes tecidos nos mamíferos. Cada uma delas possui propriedades regulatórias e cinéticas distintas, refletindo a sua importância no suprimento das necessidades metabólicas de cada tecido (Jurica et al., 1998). Os genes L e M codificam as quatro isoenzimas em humanos. O gene L codifica a isozima L encontrada no fígado e R que está presente nos eritrócitos (Noguchi et al., 1987). Já o gene M codifica as isozimas M₁ e M₂ (Noguchi et al., 1986). M₁ está predominantemente presente no músculo esquelético e no cérebro, enquanto a M₂ é encontrada primariamente no tecido fetal, células proliferativas e tumorais (Mazurek et al., 2005, Dombrauckas et al., 2005). Os

tipos M₂, L e R apresentam regulação alostérica e são ativados heterotropicamente pela frutose-1,6-bisfosfato (FBP) (Jurica et al., 1998). Por outro lado, o tipo M₁ apresenta cinética hiperbólica e não exibe regulação alostérica (Mattevi et al., 1996).

1.7. Adenilatoquinase

Outra enzima importante relacionada à homeostasia energética é a adenilatoquinase (AK, EC 2.7.4.3). Adenilatoquinase catalisa a transferência reversível de fosfatos entre ATP e AMP, conforme a reação: $2ADP \leftrightarrow ATP + AMP$ (Price et al., 1975). As moléculas envolvidas na reação da AK também influenciam na sinalização metabólica celular, principalmente o AMP que sinaliza produção de ATP pela via glicolítica (Noda, 1973; Zeleznikar et al., 1995).

Juntamente com a CK, a AK é responsável pela rede de fosforiltransferência, ou seja, elas atuam na transferência de grupamento fosforil do ATP da mitocôndria para o citosol, garantindo um fluxo de energia para os locais de demanda energética, uma vez que o ATP parece ser pouco difundido pela célula após sua produção, necessitando de um translocador macroaniônico (Ames, 2000). Reforçando essa ação em conjunto, alguns trabalhos demonstram que quando a atividade de uma delas é diminuída a outra aumenta (Dzeja et al. 1996; Dzeja et al. 1999; Dzeja et al., 2002).

Várias isoformas da AK são conhecidas, cada uma possuindo sua distribuição tecido-específica e localização subcelular (Tanable et al., 1993). Segundo Noma (2005), são conhecidas seis isoenzimas para a adenilatoquinase (AK1 a AK6). A AK1 é encontrada no citosol e a AK2 está principalmente no espaço intermembranas mitocondrial, ambas utilizam os nucleotídeos de adenina. A AK3 utiliza GTP para formação de GDP ou ADP e é encontrada na matriz mitocondrial, onde ocorre a formação de GTP pelo ciclo do ácido cítrico. AK4 e AK5 se localizam principalmente na matriz mitocondrial e no citosol, respectivamente. Adenilatoquinase do tipo 5 é

encontrada somente no cérebro. Já no núcleo celular é que encontramos a AK6. Em resumo, AK assim distribuída nos microambientes celulares auxilia na manutenção das concentrações de ATP, ADP e AMP.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da administração de histidina a ratas Wistar durante o período de gestação e amamentação sobre alguns parâmetros de metabolismo energético em córtex e hipocampo dos filhotes.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da administração de histidina na concentração de 0,5 mg/g de peso corporal a ratas Wistar durante o período de gestação e de lactação em homogeneizado de córtex cerebral e de hipocampo da prole aos 21 e 60 dias sobre os seguintes parâmetros:

- Atividade da creatinaquinase nas frações citosólica e mitocondrial;
- Atividade da enzima piruvatoquinase;
- Atividade da enzima adenilatoquinase.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho serão apresentados na sequência sob a forma de um artigo científico, o qual se encontra em fase de submissão à Revista Metabolic Brain Disease.

ARTIGO I

Effect of histidine administration to female rats during pregnancy and lactation on the enzymes activity of energy metabolism in cerebral cortex and hippocampus of the offspring

Denise Bertin Rojas, Rodrigo Binkowski de Andrade, Tanise Gemelli, Lenise Santos Oliveira, Aline Guimarães Campos, Carlos Severo Dutra-Filho, Clóvis Milton Duval Wannmacher

Artigo científico submetido para publicação no periódico

Metabolic Brain Disease

Effect of histidine administration to female rats during pregnancy and lactation on enzymes activity of energy metabolism in cerebral cortex and hippocampus of the offspring

Denise Bertin Rojas, Rodrigo Binkowski de Andrade, Tanise Gemelli, Lenise Santos Oliveira, Aline Guimarães Campos, Carlos Severo Dutra-Filho, Clóvis Milton Duval Wannmacher

Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: Clovis M D Wannmacher

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33085575; fax: +55 51 33085535. E-mail address: clovisdw@ufrgs.br

Running title: Energy metabolism in maternal histidinemia

Abstract

Histidinemia is an inborn error of metabolism of amino acids caused by deficiency of histidase activity in liver and skin with consequent accumulation of histidine in plasma and tissues. Histidinemia is an autosomal recessive trait usually considered harmless to patients and their offspring, but some patients and children born from histidinemic mothers have mild neurologic alterations. Considering that histidinemia is one of the most frequently identified metabolic conditions, in the present study we investigated the effect of L-histidine load to female rats during pregnancy and lactation on some parameters of energy metabolism in cerebral cortex and hippocampus of the offspring. Pyruvate kinase, cytosolic and mitochondrial creatine kinase activities decreased in cerebral cortex and in hippocampus of rats at 21 days of age and this pattern remained in the cerebral cortex and in hippocampus at 60 days of age. Moreover, adenylate kinase activity was reduced in the cerebral cortex and in hippocampus of the offspring at 21 days of age, whereas the activity was increased in the two tissues at 60 days of age. These results suggest that administration of L-histidine to female rats in the course of pregnancy and lactation impaired energy homeostasis in the cerebral cortex and hippocampus of the offspring. Considering that histidinemia is usually a benign condition and little attention has been given to maternal histidinemia, it seems important to perform more studies in the children born from histidinemic mothers.

Keywords: L-histidine; maternal histidinemia; creatine kinase; pyruvate kinase; adenylate kinase; energy metabolism.

Introduction

Histidinemia is an autosomal recessive inherited disorder caused by deficiency of histidase activity in liver (Auerbach et al., 1962) and skin (La Du et al 1962), leading to increased concentrations of histidine in blood, urine and cerebrospinal fluid (Levy et al, 2001). This condition was first described in 1961 in two sisters (Ghadimi et al, 1961). Although the first patients detected by neonatal screening presented language disorders and learning disabilities (La Du 1978), the follow-up of histidinemic children showed that most of them developed normally (Tada et al., 1982; Lam et al, 1996). On the other hand, the follow-up of 50 children with abnormal serum histidine levels detected by the neonatal screening program in Japan, including thorough developmental and pediatric psychiatric analyses, favor the view that histidinemia is a risk factor for the development of behavioral disorders, including learning disabilities, in individuals under specific circumstances such as abnormal perinatal events (Ishikawa, 1987). It was postulated that different genetic mechanisms could account for the 1% of histidinemic patients with neurological impairments (Taylor et al, 1991).

Maternal histidinemia has been of interest to study since histidinemia is one of the most frequently identified metabolic disorders with incidence of 1 in 8,000-12,000 born children (Levy et al, 2001). It has been shown that maternal histidinemia causes deficits in discrimination and maze learning in rats (Whitman et al, 1977) and abnormal development of neural tube and brain in mice (Kacser et al, 1979). However, a study with 10 histidinemic mothers and their sons showed that 12% of them had deficit of attention, which was considered no different than expected for the general population (Levy et al, 2004).

Several studies have shown that impairment of brain energy metabolism is associated with neurodegenerative disorders (Beal et al., 1993; Beal, 1995; Hodgkins

and Schwarcz, 1998). Decreased activity of pyruvate kinase (PK), creatine kinase (CK) and adenylate kinase (AK) has been found in the brain of animal models of some inborn errors of metabolism, such as hyperphenylalaninemia (Costabeber et al., 2003), hypertryptophanemia (Feksa et al., 2003; Cornelio et al. 2004), hyperprolinemia (Kessler et al., 2003), hyperleucinemia (Pilla et al., 2003) and cystinosis (Rech et al., 2008).

Pyruvate kinase (ATP: pyruvate 2-O-phosphotransferase, EC 2.7. 1. 40), creatine kinase (EC 2.7.3.2) and adenylate kinase (EC 2.7.4.3) are thiol-containing enzymes critical for energy metabolism in almost all mammalian tissues. PK is a crucial enzyme of glucose metabolism, the main pathway that provides energy for brain function.

CK (EC 2.7.3.2) catalyses the reversible transfer of the phosphoryl group from phosphocreatine to ADP, regenerating ATP. This enzyme exerts a key role for cellular energy metabolism of tissues with high-energy requirements (Wallimann et al, 2011). There are distinct CK isoenzymes, which are compartmentalized specifically in the places where energy is liberated (mitochondria) or utilized (cytosol) (Wallimann et al., 1992). AK catalyzes the reversible transfer of phosphate between ATP and AMP (Price et al, 1975). This enzyme, along with CK, is the main responsible for the enzymatic phosphoryltransfer network, in other words, responsible for the transfer of the phosphate of ATP from mitochondria to cytosol (Dzeja et al., 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, 2002). Considering that energy is necessary to maintain the development and regulation of brain functions, it has been postulated that alteration in CK activity may participate of a

neurodegenerative pathway leading to neuronal loss in the brain (Tomimoto et al, 1993).

Recently, we have demonstrated that histidine administration to female rats during pregnancy and lactation caused oxidative stress in cerebral cortex and hippocampus of the offspring (Rojas et al, 2012). Moreover, in a pilot study we observed reduction of cerebral cortex and hippocampus weight of the offspring of female rats receiving histidine during pregnancy and lactation, suggesting brain energy impairment. Therefore, considering that histidine load to female rats causes oxidative stress and possible brain energy impairment in the offspring, that changes in energy metabolism may be provoked by oxidative stress and have been implicated in a variety of CNS diseases, including inherited metabolic disorders, and there is no definitive information on the effects of maternal histidinemia, in the present study we investigated the activity of CK, PK and AK in cerebral cortex and hippocampus of the offspring of adult female rats treated with histidine during pregnancy and lactation.

Materials and methods

Animals and reagents

Fourteen 60-day-old female and two 70-day-old male Wistar rats obtained from the Department of Biochemistry, ICBS, UFRGS were used in the studies. The animals were mated until the females become pregnant. They had free access to water and to a standard commercial chow Supra, Porto Alegre, RS, Brazil, and temperature was maintained at $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ with a 12-12 h light/dark cycle. The “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication no. 80-23, revised 1996) were followed in all the experiments, and the experimental protocol was approved by the Ethics Committee For Animal Research of the Federal University of Rio Grande do Sul. All

chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Spectrophotometric measurements were performed in a spectrophotometer Spectronic Genesys 8, Spectronic Instruments, Rochester, New York, USA.

Treatment of the rats

Fourteen female rats and two males were randomly separated into two groups and the females received administration of 10 μ l/g of body weight of the following buffered solutions (pH was adjusted to 7.4), twice a day at 12 hour intervals: 0.5 mg/g of L-histidine (histidine group) (Dutra-Filho et al, 1989) or 0.85% saline (control group), both administered subcutaneously. Treatment of females began at the moment of the couple and continued until weaning of the offspring (at 21 postpartum days). Fourteen pups (one of each litter) were killed at 21 days of age and other fourteen animals at 60 days of age. Some animals of the offspring were used for pilot studies and the others were used for experiments not included in this manuscript.

Tissue preparation

Animals were sacrificed by decapitation without anesthesia. The brain was rapidly removed and dissected on a glass dish over ice for the experiments. After dissection, cerebral cortex and hippocampus were homogenized (1:10, w/v) in SET buffer (0.32M sucrose/1mM EGTA/10mM Tris-HCl, pH 7.4), with a Potter-Elvehjem glass homogenizer. The homogenate was centrifuged at 800 x g for 10 min at 4 °C, the pellet was discarded and half of the supernatant, containing mitochondria, cytosol and other cellular components such as endoplasmic reticulum and lysosomes, was collected for determination of AK activity. The other half was centrifuged at 10,000 x g for 15 min at 4 °C. The supernatant of the second centrifugation, containing cytosol and other cellular components as endoplasmic reticulum, was collected for determination of pyruvate kinase and cytosolic CK (BB-CK) activities. The pellet,

containing mitochondria, myelin, synaptosomes, and membrane fragments, was washed twice with the same Tris–sucrose isotonic buffer, resuspended in 65 mM Tris buffer containing 9 mM MgSO₄, pH 7.5, for determination of mitochondrial CK activity (Mi-CK). Homogenate, cytosolic and mitochondrial fractions were stored for no longer than one week at -70 °C when the assay was not carried out immediately. The enzymes activities did not change significantly stored for one week at -70 °C.

Creatine kinase activity assay

The reaction mixture contained the following final concentrations: 65 mM Tris–HCl buffer, pH 7.5, 7.0 mM phosphocreatine, 9.0 mM MgSO₄, and cytosolic or mitochondrial fraction containing approximately 1 µg of protein, in a final volume of 0.1 mL. After 5 min of pre-incubation at 37° C, the reaction was started by the addition of 0.3 µmol of ADP. The reaction was stopped after 10 min by the addition of 1 µmol of p-hydroxymercuribenzoic acid. The reagent concentrations and the incubation times were chosen to assure linearity of the enzymatic reaction. Appropriate controls were carried out to measure chemical hydrolysis of phosphocreatine and the amount of creatine already present in the enzymatic material. The creatine formed was estimated according to the colorimetric method of Hughes (1962). The color was developed by the addition of 0.1 mL of 2% α-naphthol and 0.1 mL of 0.05% diacetyl in a final volume of 1 mL and read after 20 min at 540 nm. None of the substances added to the assay medium interfered with the color development or spectrophotometric readings. Results were expressed as µmol of creatine formed per min per mg of protein.

Pyruvate kinase activity assay

Pyruvate kinase activity was assayed essentially as described by Leong et al. (1981). The incubation medium consisted of 65 mM Tris/HCl buffer, pH 7.5, 10 mM

MgCl₂, 0.16 mM NADH, 75 mM KCl, 5.0 mM ADP, 7 units of L-lactate dehydrogenase (LDH), 0.1% (v/v) Triton X-100, and 10 µL of the cytosolic fraction in a final volume of 0.5 mL. The reaction was started after 30 min of pre-incubation by the addition of 1.0 mM phosphoenol pyruvate. NADH oxidation was recorded spectrophotometrically during 2 min at 340 nm. The reagent concentrations and the incubation times were chosen to assure linearity of the enzymatic reaction. None of the substances added to the assay medium interfered with LDH activity or spectrophotometric readings. Results were expressed as µmol of pyruvate formed per min per mg of protein

Adenylate kinase activity assay

Adenylate kinase activity was measured with a coupled enzyme assay with hexokinase (HK) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), according to Oliver (1955) with the modifications introduced by Dzeja et al. (1999). The reaction mixture contained 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 1 µg of protein supernatant of the homogenate. The reaction was initiated by the addition of 2 mM ADP and the reduction of NADP⁺ was followed at 340 nm for 3 min in a spectrophotometer. ADP, NADP⁺, G6PD and HK were dissolved in water. Reagents concentration and assay time (3 min) were chosen to assure the linearity of the reaction. None of the substances added to the assay medium interfered with HK or G6PD activities or spectrophotometric readings. The results were expressed in µmol of ATP formed per min per mg of protein.

Protein determination

Protein contents of cerebral cortex and hippocampus supernatant of the homogenates, mitochondrial and cytosolic fractions were determined by the method of Lowry et al. (1951), using serum bovine albumin as the standard.

Statistical analysis

Data were analyzed by the Student t test for independent samples. All data were analyzed by the Statistical Package for the Social Science software in a PC compatible computer. Values of $p < 0.05$ were considered to be significant.

Results

We initially investigated the effect of chronic maternal administration of L-histidine in cerebral cortex and hippocampus weight of the offspring. Rats born from mothers treated with L-histidine had lower cerebral cortex weight at 21 days of age that persisted until 60 days of age, when compared to the animals whose mothers received saline solution (controls) (Fig 1). At 21 days of age (Fig 1A), cerebral cortex was reduced by 11% [$t(12) = 3.32$; $p < 0.01$] and hippocampus was reduced by 15% [$t(12) = 4.04$; $p < 0.01$]; at 60 days of age (Fig 1B), cerebral cortex was reduced by 12% [$t(12) = 3.93$; $p < 0.01$] and hippocampus was reduced by 13% [$t(12) = 3.92$; $p < 0.01$].

Considering that the significant reduction of brain weight could be caused by energy deficit, we investigated the activities of three enzymes involved in brain energy homeostasis, CK in the cytosolic and mitochondrial fractions, PK and AK in cerebral cortex and hippocampus of the offspring at 21 and 60 days of age. L-histidine administration to the mothers decreased the activities of cytosolic CK in cerebral cortex [$t(12) = 4.10$; $p < 0.01$] and in hippocampus [$t(12) = 6.15$; $p < 0.01$] of the offspring at 21 days of age (Fig 2A) and this pattern persisted in the cerebral cortex [$t(12) = 3.29$; $p > 0.01$] and in hippocampus ($t(12) = 2.23$; $p < 0.05$) until 60 days of age (Fig 2B). Mitochondrial CK activity was reduced in cerebral cortex [$t(12) = 6.56$; $p < 0.01$] and in hippocampus [$t(12) = 4.51$; $p < 0.01$] of the offspring at 21 days of age (Fig 3A) and a

similar decrease was observed in the cerebral cortex [$t(12)= 5.53$; $p < 0.01$] and hippocampus [$t(12)= 2.69$; $p < 0.01$] at 60 days of age (Fig 3B). PK activity was decreased in cerebral cortex [$t(12)= 2.19$; $p < 0.05$] and in hippocampus [$t(12)= 3.66$; $p < 0.01$] at 21 days of age (Fig4A), the same occurring in cerebral cortex [$t(12)= 2.62$; $p < 0.05$] and in hippocampus [$t(12)= 3.36$; $p < 0.01$] at 60 days of age (Fig 4B). Adenylate kinase activity was reduced in the cerebral cortex [$t(12)= 2.95$; $p < 0.01$] and in hippocampus [$t(12)= 3.88$; $p < 0.01$] of the offspring at 21 days of age (Fig 5A), whereas the activity was increased in cerebral cortex [$t(12)= 2.35$; $p < 0.05$] and in hippocampus [$t(12)= 2.62$; $p < 0.01$] at 60 days of age (Fig 5B).

Discussion

Animal models are not completely similar to human diseases in all its complexity. However, chemical animal models have been largely used because they have the advantage of study every substance known to accumulate in human disease against adequate control. Therefore, animal models are important in the investigation of pathophysiologic mechanisms of the diseases, especially in brain metabolism, helping to suggest preventive measures and new drugs for treatment (Skvorak, 2009; Moraes et al, 2010). Histidine load do not reproduces entirely histidinemia, because the enzyme histidase is active in female rats, increasing the urocanic pathway, differently from the human disease. Therefore, the chemical model used in the present work has some limitations.

Histidinemia is an inherited metabolic disorder caused by a deficiency of histidase activity, which catalyzes the conversion of L-histidine to urocanic acid. The biochemical consequences of this blockage include increased concentrations of histidine in blood, urine and cerebrospinal fluid (CSF). Although in most histidinemic individuals

this condition seems to be benign, under certain unusual circumstances, it may be harmful to the central nervous system, as noted in less than 1% of the patients with histidinemia (Levy et al., 2001). Using animal models, it has been demonstrated that histidine administration provokes reduction of locomotor activity, (Dutra-Filho et al., 1989), in vitro oxidative stress in cerebral cortex of rats (Tansini et al., 2004) and maternal histidinemia causes deficits in discrimination and maze learning in rats (Whitman et al, 1977) and abnormal development of neural tube of mice (Kackser et al., 1979). Given its high frequency (1:8,000-12,000) and that are little information about repercussion of maternal histidinemia in developing brain, in the present study we investigated the activities of important parameters of energy metabolism in cerebral cortex and hippocampus of the offspring, at 21 days and 60 days of age, from female rats subjected to L-histidine administration during pregnancy and lactation.

The results of the present investigation showed that the rats born from mothers treated with L-histidine had 11-13% less cerebral cortex and hippocampus weight at the day of weaning (21 days) and this difference persisted at 60 days of age, when compared to the animals whose mothers received saline solution (controls). This was surprising, since teratogenesis was not described in histidinemia or in children born from histidinemic mothers. It is possible that this brain alteration be species-specific, occurring in rats and not in humans. Furthermore, L-histidine administration to female rats decreased the activities of cytosolic and mitochondrial CK and PK from cerebral cortex and hippocampus of the offspring at 21 days of age and that these effects persisted until 60 days of age. On the other hand, AK activity was reduced in cerebral cortex and hippocampus of 21-days-old rats and was increased at 60 days of age. These results suggest that this amino acid can impair energy homeostasis in these two tissues.

It is possible that the reduction of cerebral cortex and hippocampus weight may be caused, at least in part, by brain energy deficit.

Coupling of spatially separated intracellular ATP-producing and ATP-consuming processes is fundamental to the bioenergetics of living organisms, maintaining a broad range of cellular activities. However, the spatial arrangements seem to be insufficient to fulfill all cellular energetic needs (Dzeja et al., 2000). Therefore, spatially arranged intracellular enzymatic networks are necessitated. These networks are catalyzed by CK, AK and glycolytic enzymes, in especial PK, to support high-energy phosphoryltransfer and signal communication between ATP-generating and ATP-consuming/ATP-sensing processes (Saks et al., 1994; Dzeja et al., 1998; Wallimann et al., 2011). This dynamic metabolic signaling through near-equilibrium enzymatic networks contributes to efficient intracellular energetic communication, maintaining the balance between cellular ATP consumption and production, maintaining a strong energetic homeostasis for preserving cell phenotype and survival under stress (Saks et al., 1994; Dzeja et al., 2000; Dzeja and Terzic, 2003; Dzeja and Terzic, 2009; Chung et al., 2010). Enzymatic capacities, isoform distribution and the dynamics of net phosphoryl flux through the integrated phosphoryltransfer systems tightly correlate with cellular functions, indicating a critical role of such networks in efficient energy transfer and distribution, thereby maintaining the cellular energetic homeostasis (Dzeja and Terzic, 2003).

AK-catalyzed reversible phosphoryltransfer between ADP, ATP and AMP molecules has been implicated in processing metabolic signals associated with cellular energy utilization (Noda, 1973; Dzeja et al., 1998). AK phosphoryltransfer system acts on β - and γ -ATP phosphoryls which is important for cellular energetics. Coordinated action of mitochondrial and cytosolic isoforms of adenylate kinase provides a

mechanism for transfer of two high-energy phosphoryls (i.e. β and γ) in one molecule of ATP from its generation to utilization sites, doubling the energetic potential of the ATP molecule (Dzeja et al., 1998). Loss of AK function can be complemented by activation of CK phosphoryltransfer (Dzeja et al., 2002). Moreover, interaction between adenylate kinase and creatine kinase phosphorelays mediates energetic remodeling in failing hearts (Dzeja et al., 2000).

CK-catalyzed phosphoryltransfer is the major component of the high-energy phosphoryltransfer and distribution network coupling ATP production in mitochondria with ATP utilization sites in excitable tissues (Saks et al, 1994; Wallimann et al., 2011). CK also plays an important role in energy supply required for cell division, cell motility and ion homeostasis in other cell types (Wyss et al., 2007). Compromised CK function is a hallmark of abnormal bioenergetics in cardiovascular, neural and other human diseases (Wyss et al., 2007). This network is recognized as an important metabolic regulator during health and disease (Wallimann et al., 1998). A decrease in CK activity is considered one of the biochemical markers of brain cell damage in age-related neurodegenerative diseases (Aksenov et al., 1997). Therefore, alteration of CK function may be an important part of a neurodegenerative pathway that leads to neuronal loss in the brain (Tomimoto et al, 1993). In addition, phosphocreatine and creatine exert neuroprotective effects against energy deprivation and glutamate excitotoxicity, attributable to an enhancement of cytosolic high-energy phosphate store (Brustovetsky et al., 2001). On the other hand, decreased CK activity may diminish creatine levels, not only reducing the efficiency of the network, but also diminishing total antioxidant capacity, since creatine has direct anti-oxidative properties (Lawler et al, 2002). Patients with creatine deficiency syndromes or creatine transporter deficiency develop mental retardation, speech and language delay, epilepsy and autistic behavior (Hahn et al.

2002). The common denominator of these disorders is the depletion of the brain creatine pool, as demonstrated by in vivo proton magnetic resonance spectroscopy (Nasrallah et al, 2010).

PK is a rate-controlling glycolytic enzyme that catalyses the irreversible conversion of phosphoenolpyruvate (PEP) to pyruvate, coupled to the synthesis of one molecule of ATP (Valentini et al, 2000). The PK-catalyzed reaction is the second ATP-generating step of the glycolytic pathway and is of particular importance in energy production during anaerobic glycolysis, yielding nearly 50% of the total ATP (Zanella et al, 2007). In most cells PK is thought to be the major regulatory enzyme of glycolysis, together with hexokinase and phosphofructokinase. Energy-rich phosphates from ATP, used to phosphorylate substrates at the mitochondrial site, can be used to phosphorylate ADP through the pyruvate kinase-catalyzed reaction at remote ATP utilization sites. Pyruvate is an intermediate metabolite in energy metabolism, serving as the final product of glycolysis and the starting substrate for the tricarboxylic acid (TCA) cycle. Pyruvate is a readily oxidized metabolic fuel that can support the cytosolic energy state, thereby maintaining cellular function in the face of oxidative stress (Mallet and Bungler, 1993; Mallet et al., 2005; Nicholls et al., 2007). Administration of pyruvate increases brain levels of NADH, which can serve as a substrate for ATP production, thereby preventing energy decline (Vlassenko et al., 2006) and neuronal apoptosis (Araki et al., 2004; Zeng et al., 2007; Mukherjee et al., 1997). Pyruvate, an important energy metabolite, is also an effective scavenger of reactive oxygen species (Das, 2006) protecting cells from death (Berry and Toms, 2006).

A diminished activity of a single enzyme of the phosphoryltransfer network is rather well tolerated. However, a decrease in the activity of two or more enzymes of this network could lead to a cumulative impairment in the communication between ATP-

generating and ATP-consuming sites (Dzeja et al., 2000). Therefore, it is feasible that the decreased activity observed in CK, AK and PK at 21 days of age in the offspring might disrupt the efficiency of the energetic network during brain development, reducing the weight of cerebral cortex and hippocampus. At 60 days of age, CK and PK activities were still reduced, but AK activity was increased. It is possible that, in the absence of the excess of L-histidine, AK increased by a compensatory mechanism, as demonstrated earlier (Dzeja et al, 1996; Dzeja et al, 2002).

It is well known that some thiol-containing enzymes, like AK, CK and PK, may have their activities altered by thiol/disulfides exchange between the protein sulfhydryl groups and disulfides (Gilbert, 1984). CK activity decreases after brain exposure to agents promoting generation of free radicals possibly by oxidation of essential cysteine residues of the enzyme (Arstall et al., 1998; Burmistrov et al., 1992; Konorev et al., 1998; Stachowiak et al., 1998; Wallimann et al., 1998; Wolosker et al., 1996). AK molecule has two important sulfhydryl groups (Weeds and Noda, 1968). In this context, we have demonstrated that metabolites accumulating in some metabolic diseases of amino acid metabolism cause oxidative stress and inhibit CK, PK and AK activities (Kessler et al., 2008; Feksa et al., 2008; Tonin et al., 2009; Rech et al., 2008; Figueiredo et al., 2009). In addition, we have demonstrated that L-histidine provokes oxidative stress in cerebral cortex in vitro (Tansini et al., 2004) and that L-histidine load to the female rats provoked oxidative stress in the developing brain of the offspring at 21 days of age that partially persisted until 60 days of age (Rojas et al, 2012), suggesting that the thiol groups of these kinases might be altered, reducing the activity of the enzymes. It is possible that disruption of ROS signalling during specific periods of development could cause long-lasting changes in physiology. We must therefore be cautious in assuming that ROS are deleterious in pregnancy, newborns or during child development, and

ensure that children and mothers are not overloaded with ‘nutritional antioxidants’ (Halliwell, 2011).

In summary, offspring of female rats loaded with L-histidine presented reduced cerebral cortex and hippocampus weight and decreased activity of CK and PK at 21 day of age, which persist until 60 days of age, whereas AK activity is decreased at 21 days of age and increase at 60 days of age. Oxidative stress caused by L-histidine is a possible mechanism for the decreased enzymatic activity. This may impair the phosphoryltransfer network and reduce creatine and pyruvate content, two important antioxidants and neuroprotectors. As a consequence, a vicious circle is established, because diminution of antioxidant defenses increases kinases inhibition which decreases pyruvate and creatine content, and so on. We know that histidine administration to female rats do not mimics human maternal histidinemia in all their biochemical aspects, and it is possible that the reduction of hippocampus and cerebral cortex weight observed in the rats may not occur in children born from histidinemic mothers. It is possible that histidinemia, usually a benign condition for children exposed to high postnatal levels of histidine, may cause alterations if the brain is exposed to high levels during intrauterine development and breastfeeding. Therefore, it seems important to perform more studies in the children born from histidinemic mothers.

Acknowledgements

This work was supported by the research grants from Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and FINEP Rede Instituto Brasileiro de Neurociência.

References

Aksenov MY, Aksenova MV, Payne RM, Smith CD, Markerbery WR, Carney JM (1997) The expression of creatine kinase isoenzymes in neocortex of patients with neurodegenerative disorders: Alzheimer's and Pick's disease. *Experim Neurol* 146:458-465.

Araki T, Sasaki Y, Milbrandt J (2004) Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science* 305: 1010-1013.

Arstall MA, Bailey C, Gross WL, Bak M, Balligand JL, Klely RA (1998) Reversible S-nitrosation of creatine kinase by nitric oxide in adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 30:979-988.

Auerbach VH, Digeorge AM, Baldrige RC, Tourtellotte CD, Brigham MP. (1962) Histidinemia. A deficiency in histidase resulting in the urinary excretion of histidine and of imidazolepyruvic acid. *J Pediatr.* 60:487-497

Berry EV, Toms NJ (2006) Pyruvate and oxaloacetate limit zinc-induced oxidative HT-22 neuronal cell injury. *Neurotoxicology* 27:1043-1051.

Beal MF, Hyman BT, Koroshetz W (1993) Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases? *Trends Neurosci* 16:125-131.

Beal M.F (1995) Aging, energy and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 38: 357–366.

Brustovetsky N, Brustovetsky T, Dubinsky JM (2001) On the mechanisms of neuroprotection by creatine and phosphocreatine. *J Neurochem* 76:425-434.

Burmistrov SO, Mashek OP, Kotin AM (1992) The action of acute alcoholic intoxication on the antioxidant system and creatine kinase activity in the brain of rat embryos. *Eksp Klin Farmakol* 55:54-56.

Chung S, Arrell DK, Faustino RS, Terzic A & Dzeja PP (2010) Glycolytic network restructuring integral to the energetics of embryonic stem cell cardiac differentiation. *J Mol Cell Cardiol* 48: 725-734.

Cornelio AR, Rodrigues V Jr, de Souza Wyse AT, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wannmacher CM (2004) Tryptophan reduces creatine kinase activity in the brain cortex of rats. *Int J Dev Neurosci*. 22:95-101.

Costabeber E, Kessler A, Severo Dutra-Filho C, de Souza Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM (2003) Hyperphenylalaninemia reduces creatine kinase activity in the cerebral cortex of rats. [Int J Dev Neurosci](#) 21: 111-116.

Dutra-Filho CS, Wannmacher CM, Pires RF, Gus G, Kalil AM and Wajner M (1989) Reduced locomotor activity of rats made histidinemic by injection of histidine. *J Nutr* 119:1223-1227.

Dzeja PP & Terzic A (2009) Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. *Int J Mol Sci* 10:1729-1772.

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

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

Dzeja PP, Redfield MM, Burnett JC & Terzic A (2000) Failing energetics in failing hearts. *Current cardiology reports* 2: 212-217.

Dzeja PP, Vitkevicius KT, Redfield MM, Burnett JC, Terzic A (1999) Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium: increased contribution in heart failure. *Circ Res* 84:1137-1143.

Dzeja PP, Zeleznikar RJ & Goldberg ND (1998) Adenylate kinase: kinetic behavior intact cells indicates it is integral to multiple cellular processes. *Molecular and cellular biochemistry* 184:169-182.

Feksa LR, Latini A, Rech VC, Feksa PB, Koch GD, Amaral MF, Leipnitz G, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wannmacher CM (2008) Tryptophan administration induces oxidative stress in brain cortex of rats. *Metab Brain Dis* 23:221-233.

Feksa [LR](#), [Cornelio AR](#), [Vargas CR](#), [de Souza Wyse AT](#), [Dutra-Filho CS](#), [Wajner M](#), [Wannmacher CM](#) (2003) Alanine prevents the inhibition of pyruvate kinase activity caused by tryptophan in cerebral cortex of rats. *Metab Brain Dis* 18:129-137.

Figueiredo VC, Feksa LR, Wannmacher CM (2009) Cysteamine prevents inhibition of adenylate kinase caused by cystine in rat brain cortex. *Metab Brain Dis* 24:373-381.

Ghadimi H, Partington MW & Hunter A (1961) A familial disturbance of histidine metabolism. *N Engl J Med* 265: 221-224.

Gilbert HF (1984) Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange. *Methods Enzymol* 107:330-351.

Hahn KA, Salomons GS, Tackels-Horne D, Wood TC, Taylor HA, Schroer RJ, Lubs HA, Jakobs C, Olson RL, Holden KR, Stevenson RE, Schwartz CE (2002) X-linked mental retardation with seizures and carrier manifestations is caused by a mutation in the creatine-transporter gene (SLC6A8) located in Xq28. *Am J Hum Genet* 70:1349-1356.

Halliwell, B (2011) Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends Pharmacol Sci* 32:125-130.

Hodgkins PS, Schwarcz R (1998) Interference with cellular energy metabolism reduces kynurenic acid formation in rat brain slices: reversal by lactate and pyruvate.

Eur J Neurosci. 10:1986-1994.

Hughes BP (1962) A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clinica Chimica Acta* 7: 597-603.

Ishikawa M (1987) Developmental disorders in histidinemia—follow-up study of language development in histidinemia. *Acta Paediatr Jpn* 29:224–228

Kacser H, Mya KM & Bulfield G (1979) Endogenous teratogenesis in maternal histidinemia. In: *Models for the Study of Inborn Errors of Metabolism* (Hommes FA, ed), pp. 43-53, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Kessler A, Biasibetti M, da Silva Melo DA, Wajner M, Dutra-Filho CS, de Souza Wyse AT, Wannmacher CM (2008) Antioxidant effect of cysteamine in brain cortex of young rats. *Neurochem Res* 33:737-744.

Kessler A, Costabeber E, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM (2003) Proline reduces creatine kinase activity in the brain cortex of rats. *Neurochem Res* 28:1175-80.

Konorev EA, Hogg N, Kalyanaraman B (1998) Rapid and irreversible inhibition of creatine kinase by peroxynitrite. *FEBS Lett* 427:171-174.

La Du BN (1978) Histidinemia. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Golgstein IL & Brown MS, eds.), pp. 317-327, McGraw-Hill, New York, NY.

La Du BN, Howell RR, Jacoby GA, Seegmiller JE & Zannoni G (1962) The enzymatic defect in histidinemia. *Biochem Biophys Res Commun* 7: 398-402.

Lam WK, [Cleary MA](#), [Wraith JE](#), [Walter JH](#) (1996) Histidinaemia: a benign metabolic disorder. *Arch Dis Childhood* 74: 343-346.

Lawler JM, Barnes WS, Wu G, Song W, Demaree S (2002) Direct antioxidant

properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun* 290:47-52.

Levy H L, Yu J J and Waisbren S E. (2004). Maternal histidinaemia: Pregnancies and offspring outcomes. *J. Inherit. Metab. Dis.* 27: 197-204.

Levy HL, Taylor RG, McInnes RR (2001) Disorders of histidine metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds); *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 1807–1820.

Leong SF, Lai JCK, Lim L and Clark JB (1981) Energy-metabolising enzymes in brain regions of adult and aging rats. *Journal of Neurochemistry* 37:1548 – 1556.

Lowry O H, Rosebrough N, Farr AL, Randal RJ (1951) Protein measurement with a folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

Mallet RT, Sun J, Knott EM, Sharma AB, Olivencia-Yurvati AH (2005) Metabolic cardioprotection by pyruvate. *Exp Biol Med* 230: 435-443.

Mallet RT, Bungler R (1993) Metabolic protection of postischemic phosphorylation potential and ventricular performance. *Adv Exp Med Biol* 346: 233-241.

Moraes TB, Zanin F, da Rosa A, de Oliveira A, Coelho J, Petrillo F, Wajner M, Dutra-Filho CS (2010) Lipoic acid prevents oxidative stress in vitro and in vivo by an acute hyperphenylalaninemia chemically-induced in rat brain. *J. Neurol. Sci.* 292: 89–95.

Mukherjee SK, Klaidman LK, Yasharel R, Adams JD (1997) Increased brain NAD prevents neuronal apoptosis in vivo. *Eur J Pharmacol* 330: 27-34.

Nasrallah F, Feki M, Kaabachi N (2010) Creatine and creatine deficiency syndromes: biochemical and clinical aspects. *Pediatr Neurol* 42:163-171.

Nicholls DG, Johnson-Cadwell L, Vesce S, Jekabson M, Yadav N (2007) Bioenergetics of mitochondria in cultured neurons and their role in glutamate excitotoxicity. *J Neurosci Res* 85: 3206-3212.

Noda LH (1973) Adenylate kinase. In *The Enzymes*, 3rd edition, vol. 8 (ed. P. D. Boyer), pp. 279-305. New York: Academic Press.

Oliver IT (1955) A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase. *Biochem J.* 61:116-122.

Pilla C, de Oliveira Cardozo RF, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM (2003) Effect of leucine administration on creatine kinase activity in rat brain. *Metab Brain Dis* 18:17-25.

Price NC, Cohn M, and Schirmer RH (1975) Fluorescent and spin label probes of the environments of the sulfhydryl groups of porcine muscle adenylate kinase. *J Biol. Chem* 250: 644-652.

Rech VC, Feksa LR, Fleck RM, Athaydes GA, Dornelles PK, Rodrigues-Junior V, Wannmacher CM (2008) Cysteamine prevents inhibition of thiol-containing enzymes caused by cystine or cystine dimethylester loading in rat brain cortex. *Metab Brain Dis* 23:133-45.

Rojas, D B, Gemelli, T, Andrade, RB, Campos, AG, Dutra-Filho, CS, Wannmacher, CMD (2012) Administration of histidine to female rats induces changes in oxidative status in cortex and hippocampus of the offspring. *Neurochem Res* DOI 10.1007/s11064-012-0703-7

Saks VA, Khuchua ZA, Vasilyeva EV, Belikova O & Kuznetsov AV (1994) Metabolic compartmentation and substrate channelling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases in in vivo regulation of cellular respiration--a synthesis. *Mol cell Biochem* 133-134: 155-192.

Skvorak KJ. (2009). Animal models of maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis* 32:229-246.

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

Tada K, Tateda H, Arashima S, Sakai K, Kitagawa T, Aoki K, Suwa S, Kawamura M, Oura T, Takesada M, Kuroda Y, Yamashita F, Matsuda I & Naruse H (1982) Intellectual development in patients with untreated histidinemia. *J Pediatr* 101: 562-563.

Tansini CM, Durigon K, Testa CG, Belló-Klein A, Wajner M, Wannmacher CMD, Wyse ATS, Dutra-Filho CS (2004) Effects of histidine and imidazolelactic acid on various parameters of the oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *Int J Devel Neuroscience* 22:67-72.

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

Tonin AM, Ferreira GC, Schuck PF, Viegas CM, Zanatta A, Leipnitz G, Seminotti B, Duvall Wannmacher CM, Wajner M (2009) Inhibition of creatine kinase activity by lysine in rat cerebral cortex. *Metab Brain Dis* 24:349-360.

Valentini G, Chiarelli LR, Fortin R, Speranza ML, Galizzi A, Mattevi A (2000) The allosteric regulation of pyruvate kinase. *J Biol Chem* 275:18145–18152.

Vlassenko AG, Rundle MM, Raichle ME, Mintun MA (2006) Regulation of blood flow in activated human brain by cytosolic NADH/NAD ratio. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 103: 1964-1969.

Wallimann T, Dolder M, Schlattner U, Eder M, Hornemann T, O'Gorman E, Rück A, Brdiczka D (1998) Some new aspects of creatine kinase (CK): compartmentation, structure, function and regulation for cellular and mitochondrial bioenergetics and physiology. *Biofactors* 8:229-234.

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

Wallimann T, Tokarska-Schlattner M, Schlattner U (2011) The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids*.40:1271-1296.

Weeds AG, Noda L (1968) Amino acid sequences around the thiol groups of myokinase. *Biochem J*. 107:311-312.

Whitman RD, Maher BA, Abeles R (1977) Deficits in discrimination and maze learning resulting from maternal histidinemia in rats. *J Abnorm Psychol*. 86:662-664

Wolosker H, Panizzutti R, Engelender S (1996) Inhibition of creatine kinase by S-nitrosoglutathione. *FEBS Lett*. 392:274-276.

Wyss M, Braissant O, Pischel I, Salomons GS, Schulze A, Stockler S & Wallimann T (2007) Creatine and creatine kinase in health and disease--a bright future ahead? *Sub-cellular biochemistry* 46: 309-334.

Zanella A, Fermo E, Bianchi P, Chiarelli LR, Valentini G (2007) Pyruvate kinase deficiency: The genotype-phenotype association. *Blood Reviews* 21: 217-231

Zeng J, Yang GY, Ying W, Kelly M, Hira K, James TL, Swanson, RA, Litt L (2007) Pyruvate improves recovery after PARP-1-associated energy failure induced by oxidative stress in neonatal rat cerebro cortical slices. *J Cereb Blood Flow Metab* 27: 304-315.

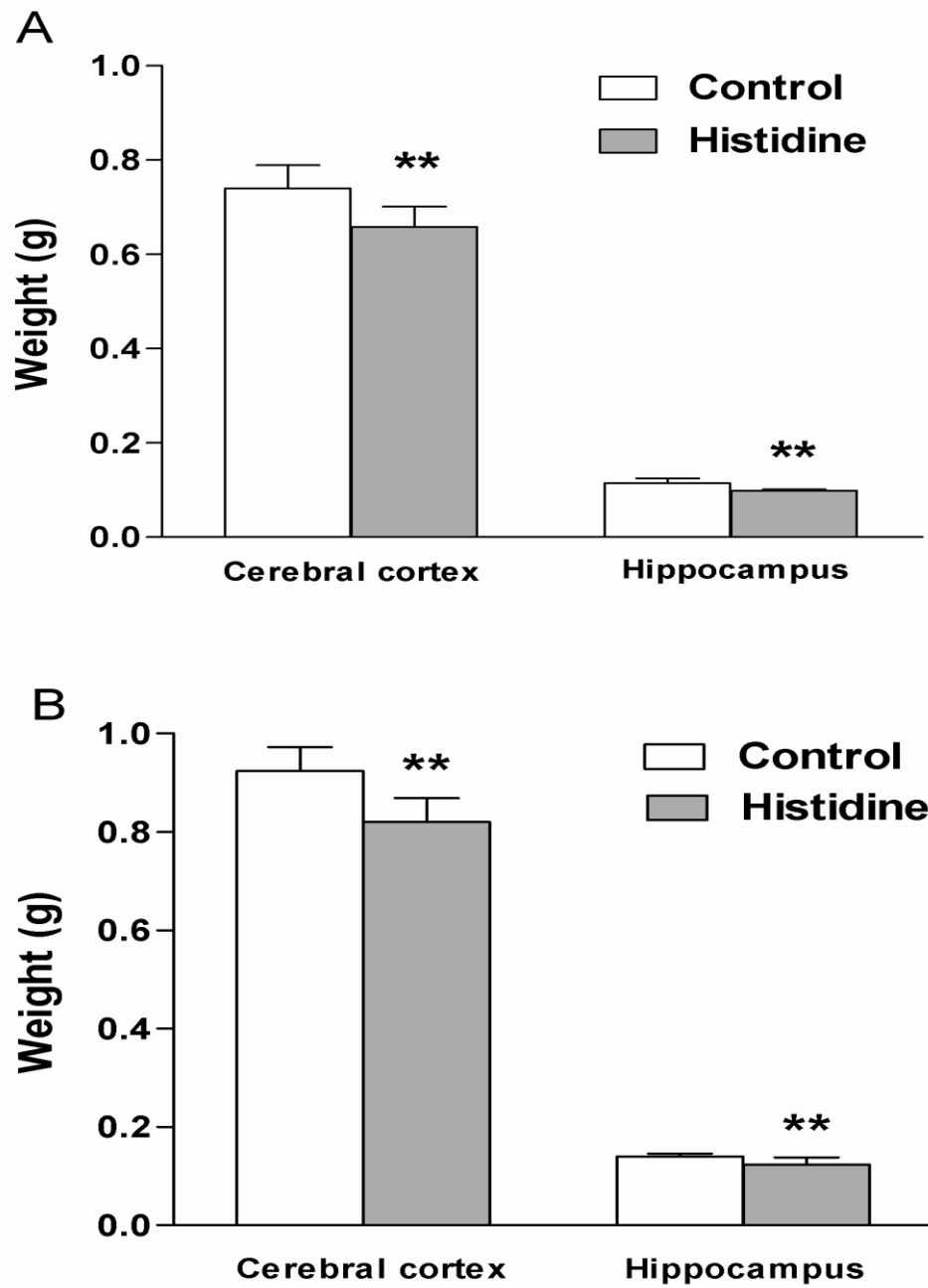


Fig 1 Cerebral cortex and hippocampus weight at 21 (A) and 60 (B) postpartum days of the offspring of female rats loaded with L-histidine during pregnancy and lactation

Data are mean \pm standard deviation for 7 animals in each group and are expressed in mg. **P< 0.01 compared to control group (Student t test for independent samples).

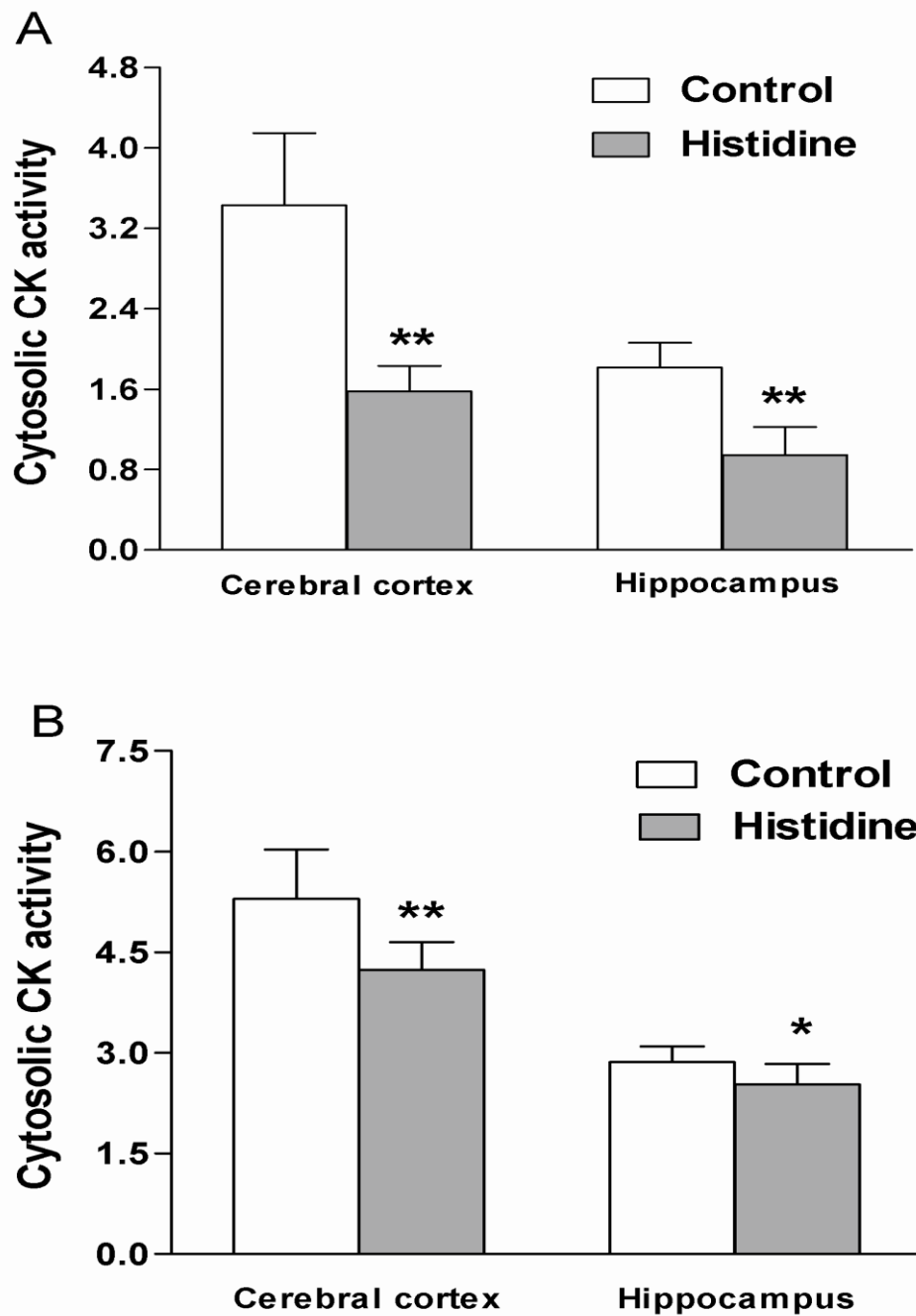


Fig 2 Cytosolic creatine kinase (CK) activity in cerebral cortex and hippocampus at 21 (A) and 60 (B) postpartum days of the offspring of female rats loaded with L-histidine during pregnancy and lactation

Data are mean \pm standard deviation for 7 animals in each group and are expressed as μmol of creatine formed per min per mg of protein. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ compared to control group (Student t test for independent samples).

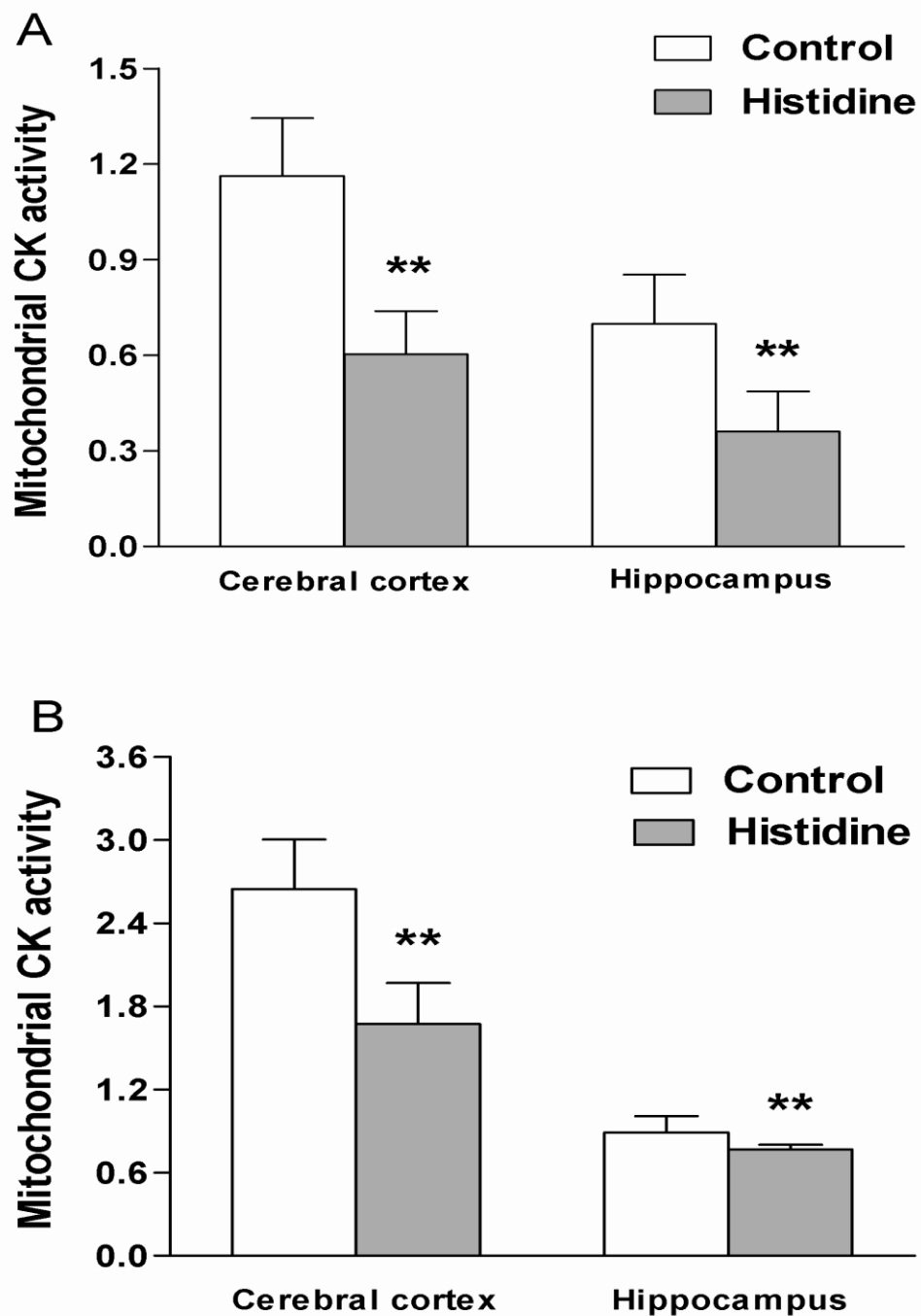


Fig 3 Mitochondrial creatine kinase (CK) activity in cerebral cortex and hippocampus at 21 (A) and 60 (B) postpartum day of the offspring of female rats loaded with L-histidine during pregnancy and lactation

Data are mean \pm standard deviation for 7 animals in each group and are expressed as μmol of creatine formed per min per mg of protein. ** $P < 0.01$ compared to control group (Student t test for independent samples).

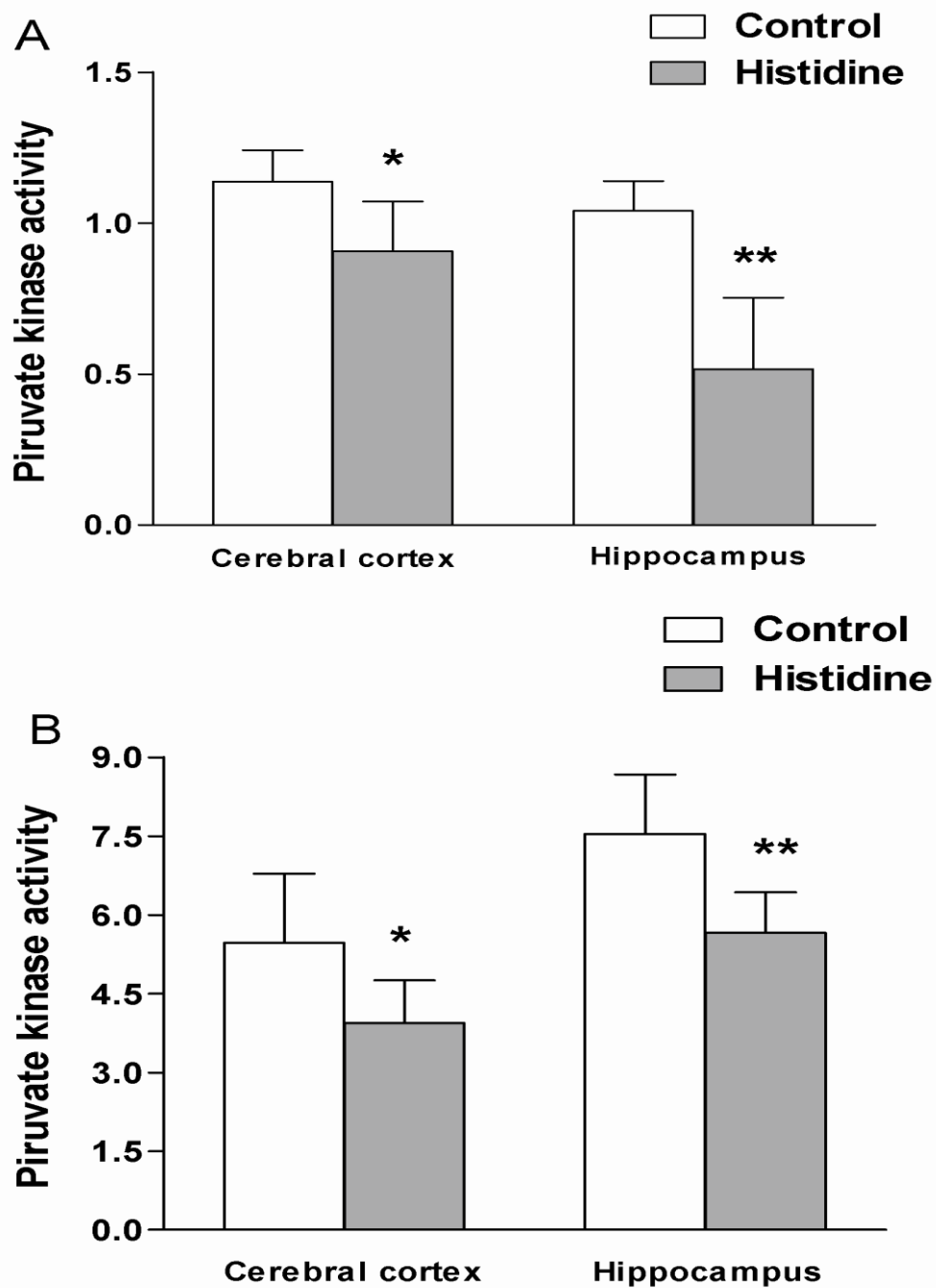


Fig 4 Pyruvate kinase (PK) activity in cerebral cortex and hippocampus at 21 (A) and 60 (B) postpartum day of the offspring of female rats treated with L-histidine during pregnancy and lactation

Data are mean \pm standard deviation for 7 animals in each group and are expressed as μmol of pyruvate formed per min per mg of protein. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ compared to control group (Student t test for independent samples).

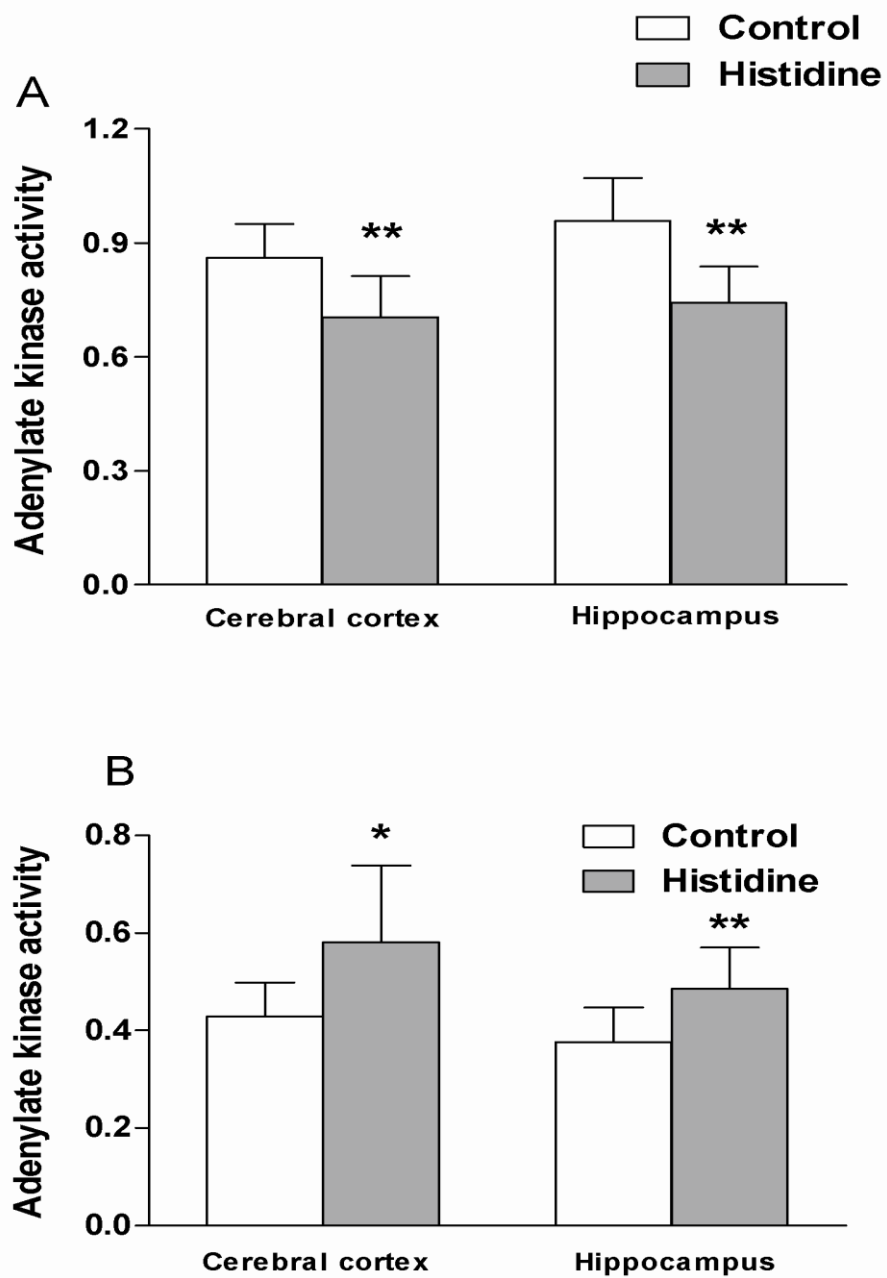


Fig 5 Adenylate kinase (AK) activity in cerebral cortex and hippocampus at 21 (A) and 60 (B) postpartum day of the offspring of female rats treated with L-histidine during pregnancy and lactation

Data are mean \pm standard deviation for 7 animals in each group and are expressed as μmol of ATP formed per min per mg of protein. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ compared to control group (Student t test for independent samples).

4. DISCUSSÃO

Concentrações elevadas de histidina no sangue, no fluido cérebro-espinhal e na urina são características bioquímicas da histidinemia devido à deficiência na atividade da enzima histidase. A incidência estimada da doença é de cerca de 1: 9600 nascidos no Japão, sendo considerada alta dada a raridade dos EIM (Levy et al., 2001). A histidinemia não apresenta um conjunto claro de sintomas, e, apesar da sua descoberta datar de 1961 (Ghadimi et al., 1961), ainda hoje se discute se ela é uma doença benigna ou não. Manifestações como retardo mental e distúrbios da fala foram associados à doença (La Du, 1978), mas posteriormente o acompanhamento dessas crianças por screening neonatal mostrou que a maioria delas não apresentava prejuízo de saúde ou de desenvolvimento intelectual (Tada et al., 1982; Lam et al., 1996). Ainda assim, acredita-se que sob algumas condições genéticas, principalmente relativas a quanto da atividade enzimática está ou não comprometida, a doença possa ser prejudicial ao sistema nervoso central (Taylor et al., 1991; Levy et al., 2001).

Nesse contexto, buscando compreender os efeitos da histidina no meio celular alguns estudos têm sido realizados. Foi observado que a L- histidina induz o aumento de aberrações cromossômicas na presença de H_2O_2 (Oya e Yamamoto, 1988), medeia o aumento da citotoxicidade induzida pelo H_2O_2 e está relacionada à quebra da fita dupla de DNA neste caso (Cantoni et al., 1994a). Além disso, já demonstramos que L- histidina provoca estresse oxidativo in vitro (Tansini et al., 2004) e que a sobrecarga de L-histidina a ratas durante a gestação e lactação resultou em estresse oxidativo no cérebro em desenvolvimento da prole aos 21 dias, o que persistiu parcialmente aos 60 dias de idade da prole (Rojas et al., 2012). É importante salientarmos a característica oxidante da L-histidina, uma vez que grupamentos tiólicos são susceptíveis ao ataque de espécies reativas, podendo levar a alterações na atividade das enzimas pela troca entre

grupamentos sulfidril por dissulfetos (Gilbert, 1984). Considerando a alta incidência da doença e que os efeitos dos altos níveis de histidina circulantes são pouco conhecidos, aliado à realidade de um grande número de pacientes com EIM estar alcançando a idade adulta em condições reprodutivas (Radomycka, 2003), neste trabalho investigamos o efeito da sobrecarga de L-histidina a ratas Wistar durante a gravidez e a lactação sobre a prole dessas mães. Deve-se salientar que nosso modelo não reproduz de maneira fidedigna a doença, pois não temos, neste caso, a inibição da enzima como acontece na histidinemia.

Inicialmente observamos que o peso do córtex cerebral e do hipocampo dos filhotes de ratas tratadas com histidina foi menor do que o dos filhotes das ratas controle (salina) aos 21 dias e essa diferença permaneceu aos 60 dias em córtex e hipocampo, o que é surpreendente, pois não há relatos de microcefalia em pacientes histidinêmicos ou em filhos de mães histidinêmicas. Além disso, a atividade das enzimas creatinaquinase citosólica e mitocondrial e da piruvatoquinase diminuiu em córtex e hipocampo da prole pela administração de histidina às mães; já a adenilatoquinase teve sua atividade reduzida apenas aos 21 dias em ambas as estruturas, enquanto aos 60 dias a atividade aumentou, quando comparadas ao grupo controle. Sabendo do envolvimento e da importância que CK, PK e AK exercem na manutenção da homeostasia energética, sugere-se que este aminoácido pode prejudicar a rede de transferência intracelular de grupamentos fosforil, prejudicando a homeostasia energética celular.

Em condições fisiológicas normais as necessidades energéticas do cérebro são fornecidas quase exclusivamente pela oxidação da glicose, mas durante um jejum prolongado aumenta a participação dos corpos cetônicos como fonte energética (Sokoloff, 1993; Dickinson, 1996). As células do sistema nervoso central requerem uma grande quantidade de energia para manter suas atividades de manutenção do potencial

de membrana pela Na^+/K^+ ATPase, homeostasia do Ca^{2+} , processo de neurotransmissão, entre outras (Ames, 2000). O acoplamento de sítios intracelulares produtores e consumidores de ATP, os quais se encontram separados espacialmente, é fundamental para a manutenção desses e de outros processos que dependem de ATP para seu funcionamento, pois a difusão dessa molécula através do citoplasma é lenta. Nesse sentido o sistema PCr/CK e a AK atuam como mecanismos que reduzem a limitação do distanciamento espacial (Dzeja et al., 1998; Ames, 2000; Dzeja et al., 2002). As enzimas glicolíticas também participam da rede de transferência de grupamentos fosforil através do fosforil vindo do ATP que entra na glicólise e, desse modo, pode fosforilar ADP através da piruvatoquinase (Dzeja et al., 1998; Dzeja e Terzic, 2003). Esse conjunto dinâmico de sinalização metabólica envolvendo a rede enzimática contribui para o balanço celular dos níveis de ATP entre os locais de produção e consumo, assim garantindo a homeostasia energética em condições de estresse metabólico (Saks et al., 1994; Dzeja et al., 2000; Dzeja e Terzic, 2003).

Creatinaquinase é o principal componente da rede de transferência de grupamentos fosforil dos locais de produção para os de consumo de ATP em tecidos excitáveis (Walliman et al., 1992; Saks et al., 1994). O comprometimento da atividade da CK tem sido relacionado ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, incluindo doença de Alzheimer (Hensley et al., 1995; Aksenov et al., 1997), doença de Huntington (Lin et al., 2011; Zhang et al., 2011) e doenças cardiovasculares (Wyss et al., 2007). A diminuição da atividade da CK pode diminuir os níveis de creatina, isso não apenas reduz a eficiência da rede, mas também diminui a capacidade antioxidante, uma vez que a creatina tem propriedades antioxidantes diretas (Lawler et al., 2002). Pacientes com alguma síndrome de deficiência da creatina apresentam retardo no desenvolvimento mental, atraso na linguagem e epilepsia (Hahn et al., 2002; Schulze,

2003). Uma característica comum nesses pacientes é a severa depleção de creatina/fosfocreatina no cérebro detectada por espectroscopia de ressonância magnética (Nasrallah et al., 2010).

Outra enzima participante da rede de fosforiltransferência dos sítios de produção para os de consumo do ATP que avaliamos foi a AK. AK é essencial para integração e sincronização do dinâmico metabolismo celular, uma vez que ela gera sinais metabólicos como o AMP que integra cascatas complexas de sinalização da AMPK, canais K-ATP (Noda, 1973; Dzeja et al., 1998). Existem evidências mostrando que defeitos na comunicação dos locais de síntese e utilização do ATP são um componente da falência cardíaca, e, em particular, na falência miocárdica ocorre diminuição de ambas as enzimas, CK e AK (Dzeja et al., 2000). Tamanha é a importância dessa cooperação para o suprimento energético que alguns trabalhos têm demonstrado que a diminuição na função de uma enzima pode ser complementada pela ativação da outra (Dzeja et al., 1996; 2002).

A piruvatoquinase é uma enzima chave na regulação da glicólise, catalisando a transformação de fosfoenolpiruvato em piruvato, que, por sua vez, é substrato da síntese de acetil-coenzima A, o principal substrato energético do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). Tem sido demonstrado que o piruvato tem propriedades antioxidantes, provavelmente atuando como *scavenger* de H_2O_2 (DeBoer et al., 1993; Brand e Hemffise, 1997), protegendo as células da morte (Berry e Toms, 2006). Além disso, na reação catalisada pela PK, a geração de ATP corresponde a cerca de 50 % do total de ATP produzido durante a glicólise anaeróbica (Zanella et al., 2007). O piruvato é um substrato energético facilmente oxidado, mantendo as funções celulares frente a condições de estresse oxidativo (Mallet et al., 2005; Nicholls et al., 2007). Administração de piruvato aumenta os níveis de NADH, o qual pode servir como

substrato para produção de ATP, assim prevenindo declínio de energia (Vlassenko et al., 2006) e apoptose neuronal (Mukherjee et al., 1997; Araki et al., 2004).

Já está bem estabelecido que enzimas que possuam grupamentos tiólicos, assim como CK, PK e AK, podem ter suas atividades alteradas pela troca de seus grupamentos sulfidrílicos por outros dissulfetos (Gilbert, 1984). A atividade da CK cerebral diminui após exposição a agentes promotores da geração de radicais livres, possivelmente por oxidação dos resíduos essenciais de cisteína da enzima (Burmistrov et al., 1992; Wolosker et al., 1996; Arstall et al., 1998; Konorev et al., 1998; Stachowiak et al., 1998; Wallimann et al., 1998). Por outro lado, a AK possui dois resíduos sulfidrílicos, mas que não estão localizados nos seu sítio ativo (Weeds e Noda, 1968). Dentro dessa linha de raciocínio, já demonstramos que metabólitos acumulados em algumas doenças metabólicas causam estresse oxidativo e inibem as atividades das enzimas CK, PK e AK (Feksa et al., 2008; Rech et al., 2008; Figueiredo et al., 2009; Tonin et al., 2009; de Andrade et al., 2011). Nesse contexto, é importante salientar que em trabalho recentemente publicado, a sobrecarga materna com histidina alterou importantes parâmetros de estresse oxidativo em córtex e hipocampo da prole, sendo que aos 21 dias houve aumento da lipoperoxidação e da produção de espécies reativas, provavelmente por aumento do ânion superóxido. Por outro lado, aos 60 dias houve uma recuperação parcial do balanço oxidativo (Rojas et al., 2012). A redução de atividade que encontramos em CK, PK e AK provavelmente leve a mudanças no balanço e no fluxo energético final disponibilizado às células, podendo comprometer o funcionamento cerebral e ser um dos mecanismos que contribua para os sinais neurológicos encontrados em alguns pacientes. Devemos lembrar que no presente estudo as atividades das enzimas diminuíram aos 21 dias, no entanto, aos 60 dias a atividade da adenilatoquinase aumentou, indicando um início de recuperação do sistema energético.

Nossos resultados corroboram com estudos prévios que mostram que quando a CK é inibida a taxa de fosforiltransferência exercida pela AK aumenta (Dzeja et al., 1996). Portanto, é possível que a atividade da AK tenha sido inibida aos 21 dias pela presença da histidina durante a gestação e a lactação, entretanto, aos 60 dias, com a ausência da sobrecarga de histidina, a atividade teria aumentado como consequência da diminuição da CK. Juntas, essas observações sugerem que a inibição simultânea das três enzimas poderia prejudicar a homeostasia energética, trazendo consequências severas para sobrevivência e funcionamento celulares.

Por fim, concluímos que é possível que a histidinemia, usualmente considerada uma doença benigna em crianças expostas a altos níveis de histidina na vida pós-natal, possa causar alterações se o cérebro for exposto a altos níveis deste aminoácido durante o desenvolvimento intrauterino e a amamentação. Salientamos a importância de que mais estudos sejam realizados avaliando crianças nascidas de mães histidinêmicas.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir:

- a atividade da creatinaquinase citosólica e mitocondrial diminuiu aos 21 e aos 60 dias de idade em córtex e hipocampo da prole de ratas Wistar tratadas com L-histidina durante a gestação e a lactação;
- a sobrecarga de L-histidina nas mães reduziu a atividade da piruvatoquinase em córtex e hipocampo da prole aos 21 e também aos 60 dias;
- a administração de L-histidina provocou diminuição na atividade da adenilatoquinase em córtex e hipocampo somente aos 21 dias, já aos 60 dias essa atividade aumentou em ambas as estruturas.

Embasados no estudo anterior de que a administração de L-histidina às ratas mães altera parâmetros do estado oxidativo celular e diante da diminuição na atividade das enzimas tiólicas CK, PK e AK podemos concluir que o estresse oxidativo seja um possível mecanismo para tal redução das atividades enzimáticas. Isso pode prejudicar a rede de fosforiltransferência, alterando a homeostasia energética, entre outros eventos. É possível que a histidinemia, uma doença normalmente benigna para crianças expostas a altos níveis de histidina pós-natal, possa causar alterações se o cérebro for exposto a uma alta concentração de histidina durante a fase de desenvolvimento intrauterino e a amamentação.

6. PERSPECTIVAS

- Avaliar o efeito de substâncias neuroprotetoras e antioxidantes sobre o efeito da L-histidina em ratas grávidas e lactantes em córtex e hipocampo da prole dessas ratas testando parâmetros de metabolismo energético, estresse oxidativo e comportamentais.

- Investigar os efeitos in vitro da histidina em parâmetros de metabolismo energético e de estresse oxidativo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS

Ames A 3rd. CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res Brain Res Rev.* 34:42-68, 2000.

Aksenov MY, Aksenova MV, Payne RM, Smith CD, Markerbery WR, Carney JM. The expression of creatine kinase isoenzymes in neocortex of patients with neurodegenerative disorders: Alzheimer's and Pick's disease. *Exp Neurol* 146:458-465, 1997.

Araki T, Sasaki Y, Milbrandt J. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science* 305: 1010-1013, 2004.

Armstrong MD. Maternal histidinaemia. *Arch Dis Child.* 50:830-1, 1975.

Auerbach VH, DiGeorge AM, Carpenter GG & Baldrige RC. Histidinemia: direct demonstration of absent histidase activity in liver. *Fed Proc* 26: 680-682, 1967.

Arstall MA, Bailey C, Gross WL, Bak M, Balligand JL, Klely RA. Reversible S-nitrosation of creatine kinase by nitric oxide in adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 30:979-988, 1998.

Benson PF and Fenson AH. *Genetic Biochemical Disorders*, Oxford, Oxford Univ. Press pp 252-255, 1985.

Berry EV, Toms NJ. Pyruvate and oxaloacetate limit zinc-induced oxidative HT-22 neuronal cell injury. *Neurotoxicology* 27:1043-1051, 2006.

Brand KA, Hermfisse U. Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J.* 11:388-95, 1997.

Bürklen TS, Schlattner U, Homayouni R, Gough K, Rak M, Szeghalmi A, Wallimann T The creatine kinase/creatine connection to Alzheimer's disease: CK-inactivation, APP-CK complexes and focal creatine deposits. *J Biomed Biotechnol.* 2006:1-11, 2006.

Burmistrov SO, Mashek OP, Kotin AM. The action of acute alcoholic intoxication on the antioxidant system and creatine kinase activity in the brain of rat embryos. *Eksp Klin Farmakol* 55:54-56, 1992.

Burton BK. Inborn errors of metabolism: the clinical diagnosis in early infancy. *Pediatrics* 79:359-369, 1987.

Cantoni O, Guidarelli A, Sestili P, Giacomoni PU, Cattabeni F. L-histidine-mediated enhancement of hydrogen peroxide-induced cytotoxicity: relationships between DNA single/double strand breakage and cell killing. *Pharmacol Res.* 29:169-78, 1994a.

Cantoni O, Sestili P, Brandi G, Cattabeni F. The L-histidine-mediated enhancement of hydrogen peroxide-induced cytotoxicity is a general response in cultured mammalian cell lines and is always associated with the formation of DNA double strand breaks. *FEBS Lett.* 353:75-78, 1994b.

Coulombe JT, Kammerer BL, Levy HL, Hirsch BZ, Scriver CR. Histidinaemia. Part III: Impact; a prospective study. *J Inherit Metab Dis.* 6:58-61, 1983.

de Andrade RB, Gemelli T, Rojas DB, Funchal C, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM. Tyrosine inhibits creatine kinase activity in cerebral cortex of young rats. *Metab Brain Dis.* 26:221-227, 2011.

DeBoer LW, Bekx PA, Han L, Steinke L. Pyruvate enhances recovery of rat hearts after ischemia and reperfusion by preventing free radical generation. *Am J Physiol.* 265:H1571-1576, 1993.

Dickinson CJ. Cerebral oxidative metabolism in hypertension. *Clin Sci (Lond).* 91:539-550, 1996.

Dombrauckas JD, Santarsiero BD, Mesecar AD. Structural basis for tumor pyruvate kinase M2 allosteric regulation and catalysis. *Biochemistry*. 44:9417-29, 2005.

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

Dzeja PP, Bortolon R, Perez-Terzic C, Holmuhamedov EL, Terzic A. Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:10156-10161, 2002.

Dzeja PP, Redfield MM, Burnett JC, Terzic A. Failing energetics in failing hearts. *Curr Cardiol Rep*. 2:212-7, 2000.

Dzeja PP, Vitkevicius KT, Redfield MM, Burnett JC, Terzic A. Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium: increased contribution in heart failure. *Circ Res* 84:1137-1143, 1999.

Dzeja PP, Zeleznikar RJ & Goldberg ND. Adenylate kinase: kinetic behavior intact cells indicates it is integral to multiple cellular processes. *Molecular and cellular biochemistry* 184:169-182, 1998.

Dzeja PP, Zeleznikar RJ, Goldberg ND. Suppression of creatine kinase-catalyzed phosphotransfer results in increased phosphoryl transfer by adenylate kinase in intact skeletal muscle. *J Biol Chem*. 271:12847-51, 1996.

Eppenberger HM, Dawson DM, Kaplan NO. The comparative enzymology of creatine kinases. I. Isolation and characterization from chicken and rabbit tissues. *J Biol Chem*. 242:204-209, 1967.

Erecińska M, Silver IA. Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol*. 43:37-71, 1994.

Erickson MC, Hultin HO. Influence of histidine on lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys*. 292:427-432, 1992.

Feksa LR, Latini A, Rech VC, Feksa PB, Koch GD, Amaral MF, Leipnitz G, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wannmacher CM. Tryptophan administration induces oxidative stress in brain cortex of rats. *Metab Brain Dis* 23:221-233,2008.

Figueiredo VC, Feksa LR, Wannmacher CM.2009 Cysteamine prevents inhibition of adenylate kinase caused by cystine in rat brain cortex. *Metab Brain Dis* 24:373-381, 2009.

Ghadimi H, Partington MW & Hunter A. A familial disturbance of histidine metabolism. *N Engl J Med* 265: 221-224, 1961.

Gilbert HF. Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange. *Methods Enzymol* 107:330-351, 1984.

Hahn KA, Salomons GS, Tackels-Horne D, Wood TC, Taylor HA, Schroer RJ, Lubs HA, Jakobs C, Olson RL, Holden KR, Stevenson RE, Schwartz CE. X-linked mental retardation with seizures and carrier manifestations is caused by a mutation in the creatine-transporter gene (SLC6A8) located in Xq28. *Am J Hum Genet* 70:1349-1356, 2002.

Hensley K, Hall N, Subramaniam R, Cole P, Harris M, Aksenov M, Aksenova M, Gabbita SP, Wu JF, Carney JM, et al. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem.* 65:2146-56, 1995.

Ishikawa M. Developmental disorders in histidinemia—follow-up study of language development in histidinemia. *Acta Paediatr Jpn* 29:224–228, 1987.

Jurica MS, Mesecar A, Heath PJ, Shi W, Nowak T, Stoddard BL. The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. *Structure.* 6:195-210, 1998.

Kacser H, Mya KM & Bulfield G. Endogenous teratogenesis in maternal histidinemia. In: (Hommes FA, ed); Models for the Study of Inborn Errors of Metabolism Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam pp. 43-53, 1979.

Kacser H, Mya KM, Duncker M, Wright AF, Bulfield G, McLaren A, Lyon MF. Maternal histidine metabolism and its effect on foetal development in the mouse. *Nature*. 265:262-266, 1977.

Kawai Y, Moriyama A, Asai K, Coleman-Campbell CM, Sumi S, Morishita H, Suchi M. Molecular characterization of histidinemia: identification of four missense mutations in the histidase gene. *Hum Genet*. 116:340-346, 2005.

Kessler A, Costabeber E, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM. Proline reduces creatine kinase activity in the brain cortex of rats. *Neurochem Res* 28:1175-80, 2003.

Konorev EA, Hogg N, Kalyanaraman B. Rapid and irreversible inhibition of creatine kinase by peroxynitrite. *FEBS Lett* 427:171-174, 1998.

Kukreja RC, Loesser KE, Kearns AA, Naseem SA, Hess ML. Protective effects of histidine during ischemia-reperfusion in isolated perfused rat hearts. *Am J Physiol*. 264: H1370-1381, 1993.

La Du BN, Howell RR, Jacoby GA, Seegmiller JE & Zannoni G. The enzymatic defect in histidinemia. *Biochem Biophys Res Commun* 7: 398-402, 1962.

La Du BN. Histidinemia. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Golgstein IL & Brown MS, eds.), pp. 317-327, McGraw-Hill, New York, NY, 1978.

Lam WK, Cleary MA, Wraith JE, Walter JH. Histidinaemia: a benign metabolic disorder. *Arch Dis Childhood* 74: 343-346, 1996.

Lawler JM, Barnes WS, Wu G, Song W, Demaree S. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun* 290:47-52, 2002.

Levy HL, Taylor RG, McInnes RR. Disorders of histidine metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds); *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 1807–1820, 2001.

Levy H L, Yu J J and Waisbren S E. Maternal histidinaemia: Pregnancies and offspring outcomes. *J. Inherit. Metab. Dis.* 27: 197-204, 2004.

Levy HL, Shih VE, Madigan PM. Routine newborn screening for histidinemia. Clinical and biochemical results. *N Engl J Med* 291:1214-1219,1974.

Lin YS, Wang CH, Chern Y. Besides Huntington's disease, does brain-type creatine kinase play a role in other forms of hearing impairment resulting from a common pathological cause? *Aging (Albany NY)*. 3:657-362, 2011.

Lyon IC, Gardner RJ, Veale AM. Maternal histidinaemia. *Arch Dis Child.* 49:581-3, 1974.

Mallet RT, Sun J, Knott EM, Sharma AB, Olivencia-Yurvati AH. Metabolic cardioprotection by pyruvate. *Exp Biol Med* 230: 435-443, 2005.

Mattevi A, Bolognesi M, Valentini G. The allosteric regulation of pyruvate kinase. *FEBS Lett.* 389:15-9, 1996.

Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol.* 15:300-8, 2005.

Mukherjee SK, Klaidman LK, Yasharel R, Adams JD. Increased brain NAD prevents neuronal apoptosis in vivo. *Eur J Pharmacol* 330: 27-34, 1997.

Nasrallah F, Feki M, Kaabachi N. Creatine and creatine deficiency syndromes: biochemical and clinical aspects. *Pediatr Neurol* 42:163-171, 2010.

Neville BG, Harris RF, Stern DJ, Stern J. Maternal histidinaemia. Arch Dis Child. 46:119-21, 1971.

Nicholls DG, Johnson-Cadwell L, Vesce S, Jekabson M, Yadav N. Bioenergetics of mitochondria in cultured neurons and their role in glutamate excitotoxicity. J Neurosci Res 85: 3206-3212, 2007.

Noda LH. Adenylate kinase. In The Enzymes, 3rd edition, vol. 8 (ed. P. D. Boyer). New York: Academic Press, pp. 279-305, 1973.

Noguchi T, Yamada K, Inoue H, Matsuda T, Tanaka T. The L- and R-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from a single gene by use of different promoters. J Biol Chem. 262:14366-71, 1987.

Noguchi T, Inoue H, Tanaka T. The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. J Biol Chem. 261:13807-12, 1986.

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

Obata T, Yamanaka Y. Protective effect of histidine on potassium chloride depolarization enhances 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced hydroxyl radical generation in the rat striatum. Life Sci. 68:689-697, 2000.

Obata T, Kubota S, Yamanaka Y. Protective effect of histidine on par-nonylphenol-enhanced hydroxyl free radical generation induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) in rat striatum. Biochim Biophys Acta. 1568:171-175, 2001.

Oya Y, Yamamoto K. The biological activity of hydrogen peroxide. IV. Enhancement of its clastogenic actions by coadministration of L-histidine. Mutat Res. 198:233-40, 1988.

Price NC, Cohn M, and Schirmer RH. Fluorescent and spin label probes of the environments of the sulfhydryl groups of porcine muscle adenylate kinase. *J Biol. Chem* 250: 644-652, 1975.

Radomyska B. Pregnancy and inborn errors of metabolism. *Ginekol Pol* 74:479-485, 2003.

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* 23:133-145, 2008.

Rojas, D B, Gemelli, T, Andrade, RB, Campos, AG, Dutra-Filho, CS, Wannmacher, CMD (2012) Administration of histidine to female rats induces changes in oxidative status in cortex and hippocampus of the offspring. *Neurochem Res* DOI 10.1007/s11064-012-0703-7

Saks VA, Khuchua ZA, Vasilyeva EV, Belikova O & Kuznetsov AV. Metabolic compartmentation and substrate channelling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases in in vivo regulation of cellular respiration--a synthesis. *Mol cell Biochem* 133-134: 155-192, 1994.

Schlattner U, Tokarska-Schlattner M, Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 1762:164-180, 2006.

Schulze A. Creatine deficiency syndromes. *Mol Cell Biochem.* 244:143-50, 2003.

Scriber CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. (Eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8^a edition. New York, McGraw-Hill.3-45, 2001.

Snyderman SE, Boyer A, Roitman E, Holt LE Jr, Prose PH. The histidine requirement of the infant. *Pediatrics.* 31:786-801, 1963 .

Sokoloff L. Function-related changes in energy metabolism in the nervous system: localization and mechanisms. *Keio J Med.* 42:95-103, 1993.

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

Stifel FB, Herman RH. Is histidine an essential amino acid in man? *Am J Clin Nutr.* 25:182-5, 1972.

Tada K, Tateda H, Arashima S, Sakai K, Kitagawa T, Aoki K, Suwa S, Kawamura M, Oura T, Takesada M, Kuroda Y, Yamashita F, Matsuda I & Naruse H. Intellectual development in patients with untreated histidinemia. *J Pediatr* 101: 562-563, 1982.

Tanabe T, Yamada M, Noma T, Kajii T, Nakazawa A. Tissue-specific and developmentally regulated expression of the genes encoding adenylate kinase isozymes. *J Biochem* 113:200-207, 1993.

Tansini CM, Durigon K, Testa CG, Belló-Klein A, Wajner M, Wannmacher CMD, Wyse ATS, Dutra-Filho CS. Effects of histidine and imidazolelactic acid on various parameters of the oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *Int J Devel Neurosci* 22:67:72, 2004.

Taylor RG, Levy HL, McInnes RR. Histidase and histidinemia. Clinical and molecular considerations. *Mol Biol Med* 8:101-116, 1991.

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

Tonin AM, Ferreira GC, Schuck PF, Viegas CM, Zanatta A, Leipnitz G, Seminotti B, Duvall Wannmacher CM, Wajner M. Inhibition of creatine kinase activity by lysine in rat cerebral cortex. *Metab Brain Dis* 24:349-360, 2009.

Valentini G, Chiarelli LR, Fortin R, Speranza ML, Galizzi A, Mattevi A. The allosteric regulation of pyruvate kinase. *J Biol Chem* 275:18145–18152, 2000.

Vargas JE, Levy HL. Maternal and fetal considerations in metabolic disorders. *J Jap Soc Mass-Screening* 8:29-45, 1998.

Virmani K, Widhalm K. Histidinemia: a biochemical variant or a disease? *J Am Coll Nutr* 12:115-24, 1993.

Vlassenko AG, Rundle MM, Raichle ME, Mintun MA. Regulation of blood flow in activated human brain by cytosolic NADH/NAD ratio. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 103: 1964-1969, 2006.

Wallimann T, Tokarska-Schlattner M, Schlattner U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids*.40:1271-1296, 2011.

Wallimann T, Dolder M, Schlattner U, Eder M, Hornemann T, O'Gorman E, Rück A, Brdiczka D. Some new aspects of creatine kinase (CK): compartmentation, structure, function and regulation for cellular and mitochondrial bioenergetics and physiology. *Biofactors* 8:229-234, 1998.

Wallimann T. Bioenergetics. Dissecting the role of creatine kinase. *Curr Biol* 4:42-6, 1994.

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

Weeds AG, Noda L. Amino acid sequences around the thiol groups of myokinase. *Biochem J.* 107:311-312, 1968.

Wolosker H, Panizzutti R, Engelender S. Inhibition of creatine kinase by S-nitrosoglutathione. *FEBS Lett.* 392:274-276, 1996.

Wyss M, Braissant O, Pischel I, Salomons GS, Schulze A, Stockler S & Wallimann T. Creatine and creatine kinase in health and disease--a bright future ahead? *Sub-cellular biochemistry* 46: 309-334, 2007.

Zanella A, Fermo E, Bianchi P, Chiarelli LR, Valentini G. Pyruvate kinase deficiency: The genotype-phenotype association. *Blood Reviews* 21: 217-231, 2007.

Zhang SF, Hennessey T, Yang L, Starkova NN, Beal MF, Starkov AA. Impaired brain creatine kinase activity in Huntington's disease. *Neurodegener Dis* 8:194-201, 2011.

Zeleznikar RJ, Dzeja PP, Goldberg ND. Adenylate kinase-catalyzed phosphoryl transfer couples ATP utilization with its generation by glycolysis in intact muscle. *J Biol Chem.* 270:7311-9, 1995.