

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**Efeito de aminoácidos acumulados na fenilcetonúria, hipertriptofanemia e cistinose
sobre a atividade da piruvatoquinase em córtex cerebral de ratos**

Luciane Rosa Feksa

Orientador: Prof. Dr. Clóvis Milton Duval Wannmacher

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do título de
Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre, 2004.

Dedico esta tese ao meu filho, Lucas, que trouxe muita alegria em minha vida e é a razão e motivo pelo qual quero viver e vencer.

Desconstrução

Suspendo o cerebelo
Com dois andaimes de ar;
por baixo meu escalpelo
vai cortando devagar.
Ouço o cérebro gritar
Inconsistentes promessas:
Hipocampos são peças
De um simples jogo de armar.
Hipotálamo dissecado,
Esfera de luz amarela
Deixa vazio o seu lar
E o corpo estriado revela.
E tudo está separado,
cada órgão isolado,
limpo, medido e pesado.
Memória, emoção, pensamento,
Procuro a cada momento.
Encontro alguns compostos,
muitos restos decompostos.
Vida ceifada tristemente
Procurando inutilmente
Na matéria inútil, a mente.

Clóvis Wannmacher

Agradecimentos

Ao pequeno e grande orientador, Prof. Clóvis, agradeço pela ajuda, compreensão e imensa sabedoria com que orientou esse trabalho. Agradeço pelo seu apoio e a grande amizade que sempre tivemos ao longo desses anos. Agradeço também pelas longas conversas sobre a vida, conselhos e palavras carinhosas ditas em momentos difíceis da minha vida.

À Andréa, bolsista de iniciação científica, pela ajuda constante e incansável em minha tese, e pelo carinho.

Aos colegas do laboratório 34 C, Virgínia, Andréa, Tati, Drica, Rochele pelo convívio, amizade, apoio e muitos momentos alegres que passamos juntos.

Aos bolsistas: Júnior, Genaro, Juliana, Daiane, pelo convívio e apoio.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS, especialmente à Cléia, pela atenção e interesse pelos alunos.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pela formação e pela possibilidade de realizar esse trabalho de pesquisa.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro, o qual proporcionou-me a chance de obter o título de Doutor em Bioquímica.

À minha mãe, minha primeira orientadora, maior torcedora.

Ao meu filho, Lucas, que amo tanto e que trouxe para mim, muita força e vontade de vencer.

Ao meu marido, Clério, por estar ao meu lado.

À Clarice, minha amiga e que sempre torceu por mim.

A Deus e também a mim, por tornar tudo isso possível.

Resumo

A cistinose é uma desordem sistêmica de estocagem autossômica recessiva hereditária rara, causada pelo transporte deficiente de cistina através da membrana lisossomal. O acúmulo excessivo de cistina dentro dos lisossomos leva à destruição tecidual por mecanismos ainda não totalmente compreendidos. O acúmulo de cistina no sistema nervoso central pode provocar sintomas neurológicos tais como: convulsões, tremores e retardo mental.

A hipertriptofanemia é uma desordem metabólica rara, provavelmente causada por um bloqueio na conversão do triptofano a quinurenina, acumulando triptofano e alguns de seus metabólitos no plasma e tecidos dos pacientes. Os pacientes apresentam retardo mental leve a moderado com respostas afetivas exageradas, mudanças periódicas de humor, comportamento hipersexual, e ataxia, além de erosões cutâneas de hipersensibilidade e retardo no crescimento.

A fenilcetonúria é um erro inato do metabolismo causado pela deficiência severa na atividade da enzima fenilalanina hidroxilase hepática que converte fenilalanina em tirosina. Esta doença é bioquimicamente caracterizada pelo acúmulo de fenilalanina e seus metabólitos, fenilpiruvato, fenillactato, fenilacetato, feniletilamina e O-hidroxfenilacetato no sangue e outros tecidos. Pacientes não tratados podem apresentar severo retardo mental e psicomotor e, em alguns pacientes, irritabilidade, movimentos despropositados, reflexos diminuídos dos tendões, convulsões, formação deficiente de mielina e microcefalia. Apesar de haver um consenso sobre o papel da fenilalanina no dano cerebral, os mecanismos pelos quais a fenilalanina é neurotóxica parece serem múltiplos e ainda pouco conhecidos.

Estas 3 doenças: fenilcetonúria, hipertriptofanemia e cistinose são caracterizadas como Erros Inatos do Metabolismo. Os pacientes afetados por qualquer uma destas patologias apresentam uma característica clínica comum: o dano cerebral. Considerando que o metabolismo energético parece estar alterado nas três doenças e que a piruvatoquinase é uma enzima crucial para o metabolismo da glicose e liberação/armazenamento de energia para o cérebro, decidimos estudar o efeito dos três aminoácidos acumulados nestas doenças (fenilalanina, triptofano e cistina) sobre a atividade desta enzima em córtex cerebral de ratos, já que a alteração da atividade dessa enzima poderia contribuir para o dano cerebral característico nestes pacientes.

Os estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a o fenilalanina e o triptofano inibem a atividade da piruvatoquinase e que esta inibição pode ser prevenida por alanina. Quanto à cistina, os estudos *in vitro* mostraram que este aminoácido inibe a atividade da piruvatoquinase por dois mecanismos distintos, um dos quais parece envolver os grupos tiólicos da enzima e que pode ser prevenido e revertido pela cisteamina. Os estudos cinéticos sugeriram que a piruvatoquinase possui um sítio de ligação para aminoácidos (e talvez para alguns derivados de aminoácidos, como o fenilpiruvato) regulando a atividade da enzima.

Se a inibição da atividade da piruvatoquinase também ocorrer nos pacientes afetados pelas doenças estudadas, é possível que medidas tais como a suplementação dietética de alanina e de glicose para os pacientes com fenilcetonúria e hipertriptofanemia e de cisteamina para os pacientes com cistinose, sejam benéficas. Entretanto, mais estudos são necessários antes de considerar o uso de tais medidas para os pacientes.

Lista de Abreviaturas

Ala- alanina

ADP- adenosina difosfato

ATP- adenosina trifosfato

CO₂ - gás carbônico

CysN- cisteamina

EIM- erros inatos do metabolismo

FBP- frutose-1,6-bifosfato

GSH- glutationa reduzida

H⁺ próton

HPA- hiperfenilalaninemia

HPA*- *O*-hidroxifenilacetato

H₂O- água

K⁺ - potássio

LDH- lactato desidrogenase

Mg²⁺ - magnésio

Mn²⁺ - manganês

Na⁺ sódio

NADH- nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NADPH- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

O₂ - oxigênio molecular

PAH- fenilalanina hidroxilase

PA- fenilacetato

PE- feniletilamina

PEP- fosfoenolpiruvato

Phe- fenilalanina

PK- piruvatoquinase

PKU- fenilcetonúria

PL- fenilactato

PPA- fenilpiruvato

Ser- serina

SNC- sistema nervoso central

Trp- triptofano

Tyr- tirosina

5-HIAA- 5-hidroxi-indolacético

IAA- indolacético

Lista de Figuras

Figura 1: Via principal e uma das vias secundárias de degradação da fenilalanina...	24
Figura 2: Mecanismo de Depleção da Cistina pela Cisteamina.....	33
Figura 3: Sistema de Transporte Lisossomal Específico de Cisteína-Cistina.....	36
Figura 4: Metabolismo do Triptofano.....	41
Figura 5: Piruvatoquinase de mamíferos.....	44
Figura 6: Teoria: sítio de ligação para fenilalanina, triptofano, cistina, fenilpiruvato, serina , alanina e os substratos ADP e PEP fora do centro ativo da piruvatoquinase...	63
Figura 7: Teoria: forma R (ativa) e forma T (inativa) da piruvatoquinase.....	63

Sumário

I. Introdução.....	11
1. Erros Inatos do Metabolismo.....	12
1.1. Histórico.....	12
1.2. Conceito.....	13
1.3. Classificação	13
1.4. Sintomatologia.....	16
1.5. Frequência.....	16
1.6. Modelos Animais	17
2. Hiperfenilalaninemia e Fenilcetonúria.....	19
2.1. Conceito e Etiologia	19
3. Cistinose.....	24
3.1. Conceito e Etiologia	24
3.2. Depósitos de cistina na cistinose.....	27
3.3. Fisiopatogenia.....	29
3.4. Diagnóstico.....	30
3.5. Tratamento.....	30
3.6. Mecanismo de Depleção da Cistina pela Cisteamina.....	31
3.7. Sistema de transporte Lisossomal Específico de Cisteína – Cistina.....	33
4. Hipertriptofanemia.....	37
4.1. Conceito e Etiologia.....	37
4.2. Metabolismo do Triptofano.....	39
5. Piruvatoquinase.....	41
6. Alguns Aspectos do Metabolismo de Carboidratos no Cérebro.....	44
II. Objetivos.....	
III. Resultados.....	48
Artigo 1: Alanine prevents the reduction of pyruvate kinase activity in brain cortex of rats subjected to chemically induced hyperphenylalaninemia.....	50
Artigo 2: Characterization of the inhibition of pyruvate kinase caused by phenylalanine e phenylpyruvate in rat brain cortex	51
Artigo 3: Inhibition of pyruvate kinase activity by cystine in brain cortex of rats....	52
Artigo 4: Alanine prevents the inhibition of pyruvate kinase activity caused by tryptophan in cerebral cortex of rats	53
Artigo 5: Kinetics of the interaction between amino acids on pyruvate kinase activity from brain cortex of developing rats	54
IV. Discussão.....	55
V. Conclusões.....	56
VI. Perspectivas.....	64
VII. Referências Bibliográficas Adicionais.....	69
	71

I. Introdução

1- Erros Inatos do Metabolismo

1.1 – Histórico

Em 1908, Archibald Garrod verificou que irmãos, filhos de pais normais e cosangüíneos, excretavam quantidades elevadas de ácido homogentísico e que essa condição tinha uma distribuição familiar. Esses casos poderiam ser explicados por defeitos hereditários e de herança autossômica recessiva, baseado nas leis de Mendel. A partir de suas observações, Garrod desenvolveu o conceito de que algumas doenças ocorriam por causa da deficiência de uma enzima responsável por uma rota metabólica. A alcaptonúria, por exemplo, acontece por uma deficiência na oxidação do ácido homogentísico, um metabólito da tirosina. Além da alcaptonúria, Garrod estudou casos de cistinúria, pentosúria e albinismo.

Em 1945, Beadle propôs a hipótese “um gene – uma enzima”, onde um gene específico está relacionado à síntese de uma cadeia polipeptídica específica. Assim, um defeito genético levaria a um defeito enzimático, esclarecendo a causa dos erros inatos do metabolismo (EIM), como, por exemplo, defeitos em genes que codificam as enzimas envolvidas em determinadas rotas metabólicas (Scriver et al, 2001). Em 1948, Gibson demonstrou o primeiro defeito enzimático em uma doença genética humana, a deficiência de uma enzima NADH-dependente, necessária para a redução da meta-hemoglobina, na meta-hemoglobinemia recessiva. A primeira evidência direta de que mutações humanas realmente produzem uma alteração na estrutura primária das proteínas foi obtida por Pauling e colaboradores, em 1949, quando demonstraram um padrão de migração eletroforética diferente para a hemoglobina de pacientes com anemia falciforme. Em estudos

subseqüentes, estabeleceu-se que esta diferença era devida à substituição de um resíduo de valina por um de ácido glutâmico em um ponto da seqüência de aminoácidos (Beaudet et al, 1989).

Essas descobertas permitiam o estabelecimento do conceito de que os EIM são causados por genes mutantes que levam à produção de proteínas anormais cuja atividade funcional está alterada (Beaudet et al, 1989; Scriver et al, 2001).

Considerando que todas as doenças monogênicas devem ter uma base metabólica, já que a ausência ou anormalidade de um gene determina a falta ou alteração do seu produto, Danks (1981) prefere utilizar a denominação erro inato do metabolismo somente para aquelas situações geneticamente determinadas resultantes da deficiência de uma enzima, que provocam a falha de algum passo do metabolismo intermediário. Exclui, portanto, os defeitos em outras proteínas não enzimáticas, como por exemplo, as hemoglobinopatias e as talassemias.

1.2. Conceito de Erros Inatos do Metabolismo

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

1.3 – Classificação dos Erros Inatos do Metabolismo

Em 1982, Sinclair propôs uma classificação para os EIM:

1. *Doenças de Transporte*: são aquelas que afetam o transporte renal e/ou intestinal de moléculas inorgânicas ou orgânicas e determinam graus variáveis de depleção tecidual e desnutrição. Ocorrem perdas renais primárias ou secundárias à absorção de metabólitos intestinais. São exemplos deste grupo as deficiências de dissacaridases, defeitos no transporte de magnésio, Doença de Hartnup, entre outros (Sanseverino et al, 1992).

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

3. *Doenças da Síntese*: São aquelas em que há síntese incompleta ou anormal de moléculas biologicamente importantes, como hormônios, moléculas de função estrutural ou imunológica, proteínas plasmáticas e enzimas destinadas ao plasma. Nesse último caso, ocorre hiperplasia do órgão que produz a molécula deficiente. A terapêutica da reposição é freqüentemente eficiente. Um exemplo típico é a hiperplasia adrenal congênita por deficiência de 21-hidroxilase da rota da síntese do cortisol.

4. *Doenças do Metabolismo Intermediário*: São aquelas que comprometem as vias de metabolização de pequenas moléculas. O defeito enzimático pode ocorrer ao nível de rotas metabólicas importantes (ciclo dos ácidos tricarbóxicos e ciclo da uréia). A gravidade e a forma de instalação da doença dependem, em geral, da severidade da deficiência enzimática

e da rota metabólica comprometida. Costumam ser agravadas por infecções e outros fatores que aumentam o catabolismo. Apresentam, em comum, o acúmulo de metabólitos tóxicos na célula, provocando alterações bioquímicas locais e dano tecidual. Os metabólitos são liberados na circulação e eliminados na urina e podem provocar danos em outros tecidos, quando suscetíveis à sua toxicidade. Algumas doenças deste grupo costumam responder bem à restrição dietética. São exemplos deste grupo, os defeitos no ciclo da uréia, os distúrbios do metabolismo da frutose, galactose e pentoses, os distúrbios do metabolismo dos aminoácidos, dos ácidos orgânicos, as profirias e os distúrbios do metabolismo das purinas.

Outra classificação mais completa dos EIM, leva em conta a *área do metabolismo afetada* (Scriver et al, 2001).

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

Os EIM são doenças raras, de forma individual, mas como grupo apresentam uma frequência relativamente alta, podendo ocorrer 1 caso em aproximadamente cada 1.000 nascimentos (Giugliani, 1988).

1.4 – Sintomatologia dos Erros Inatos do Metabolismo

Os EIM apresentam manifestações clínicas muito variadas e inespecíficas. A variação ocorre por diferenças no grau de deficiência enzimática, área do metabolismo e tecidos afetados. No entanto, algumas manifestações clínicas ocorrem com mais frequência nos EIM, de modo geral, como deficiências no crescimento, vômitos, diarreia, letargia, coma, convulsões, dificuldade alimentar, hipotonia, dificuldades respiratórias, apnéia, hepatomegalia, odor anormal na urina ou na pele, anormalidades oculares, atraso no desenvolvimento psicomotor e, principalmente, retardo mental progressivo (Burton et al, 1987; Scriver et al, 2001).

1.5 – Frequência dos Erros Inatos do Metabolismo

Os EIM que em 1986 compreendiam mais de três centenas de distúrbios genéticos (Mckusick, 1986), em 2001 já compreendiam mais de cinco centenas de distúrbios (Scriver 2001) ocasionados por alteração de uma proteína, geralmente enzimática, com repercussão nos processos de síntese, degradação, transporte ou armazenamento de moléculas no organismo (Sinclair, 1982).

Apesar de individualmente raros, os EIM são frequentes em seu conjunto, estimando-se que ocorram em frequência superior a 1 caso para cada 1.000 recém-nascidos (Giugliani et al, 1988; Lubs et al, 1977).

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

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

1.6 – Modelos Animais de Erros Inatos do Metabolismo

Herschkowitz, em 1982, apontava que nenhum erro inato tinha tido seu processo patogênico completamente desvendado e que uma grande lacuna parecia existir entre a alteração na atividade enzimática observada e as alterações funcionais da doença em questão. Dezesete anos depois, pelo menos no que diz respeito aos erros inatos que afetam o sistema nervoso, esta afirmativa parece ser tão atual quanto no dia em que foi escrita. Muitos passos podem ser conhecidos, como a atividade enzimática anormal, a qual pode ser

devida a uma estrutura anormal da proteína enzimática ou uma quantidade diminuída da mesma. Metabólitos anormais podem estar presentes, ou metabólitos normais podem se acumular intracelularmente. Algumas vezes, a localização celular do defeito é conhecida, assim como as estruturas cerebrais que são afetadas pelo metabolismo anormal. Mas esta gama de informações ainda não explica completamente os distúrbios funcionais freqüentemente observados nos erros inatos, e o preenchimento desta lacuna parece envolver questões de difícil resolução, como a determinação da hierarquia das causas, a distinção entre o que é causa e efeito, e a determinação de que forma se relacionam estrutura e função, tanto no âmbito molecular como celular. Neste sentido, o estudo de modelos animais de erros inatos do metabolismo humano parece ser de grande valia para investigar a patogenia destas doenças. Embora, nenhum modelo animal possa reproduzir completamente a doença humana, os modelos animais podem nos auxiliar a compreender pelo menos alguns aspectos da doença, e as vantagens de se estudar tais modelos incluem a possibilidade de : investigar indivíduos com características genéticas muito semelhantes, o que dificulta a interferência de fatores relacionados à variabilidade genética, estudar os mecanismos patogênicos através de uma abordagem compreensiva e multidisciplinar, realizar o estudo durante o desenvolvimento dos vários estágios da doença, e não só na sua fase terminal e irreversível; facilitar a dosagem de metabólitos nos compartimentos intra e extracelular, e estabelecer um controle rígido sobre as condições ambientais. Estes modelos animais valem-se, portanto, de abordagens não possíveis de serem realizadas em seres humanos, além de permitirem separar possíveis fatores causadores das patologias (Lo, 1996).

2 - Hiperfenilalaninemia e Fenilcetonúria

2.1 – Conceito e Etiologia (Caracterização)

Hiperfenilalaninemia (HPA) é o termo genérico para identificar as concentrações persistentemente elevadas da fenilalanina (Phe), acima dos valores plasmáticos considerados normais (Scriver e Kaufman, 2001). As causas genéticas da HPA incluem mutações no gene da enzima hepática fenilalanina hidroxilase (EC 1.14.16.1) (PAH). A fenilcetonúria (PKU) é um erro inato do metabolismo, causado pela deficiência severa na atividade da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH) hepática que converte fenilalanina (Phe) em tirosina (Tyr). A Phe é um aminoácido essencial que é principalmente convertido a tirosina no organismo dos mamíferos. Esta doença é bioquimicamente caracterizada pelo acúmulo de Phe e seus metabólitos, fenilpiruvato (PPA), fenillactato (PL), fenilacetato (PA), feniletilamina (PE) e *O*-hidroxifenilacetato (HPA*) no sangue e outros tecidos (Figura 1). Dependendo da atividade residual da enzima PAH, os níveis de Phe no sangue destes pacientes com uma dieta normal, pode atingir concentrações acima de 1,2 mM (PKU clássica), entre 0,6 e 1,2 mM (PKU intermediária) ou abaixo de 0,6 mM (hiperfenilalaninemia não-PKU) (Scriver e Kaufman, 2001). O valor da Phe livre no plasma de pessoas normais não é significativamente diferente em jovens e adultos. Valores em recém-nascidos e crianças mais velhas são semelhantes aos dos adultos (abaixo de 0,1 mM).

A PKU tem incidência de 8 para 100.000 nascidos vivos e é transmitida por genes autossômicos recessivos (Nelson e Cox, 2000). Em indivíduos homocigotos, a atividade enzimática pode apresentar-se alterada (K_m ou V_{max} modificados) ou estar ausente. Os heterocigotos não manifestam a doença, pois um alelo normal determina síntese suficiente

da enzima (Marzzoco e Torres, 1990) A fenilcetonúria é a causa mais comum dos níveis elevados de Phe no sangue. Quando a PAH é geneticamente defeituosa, uma via secundária do metabolismo da Phe, normalmente pouco empregada, passa a ser mais intensamente utilizada (Figura 1). Nesta via, a reação inicial mais significativa é a transaminação da Phe para formar fenilpiruvato, tornando-se uma via funcionalmente significativa já que esta reação é induzida pelo substrato, embora não seja completamente operativa em recém-nascidos prematuros ou na primeira fase de HPA. Ambos, fenilalanina e fenilpiruvato, são acumulados no sangue e tecidos e excretados na urina, razão pela qual esta condição patológica é chamada de fenilcetonúria (Lehninger et al, 1993; Scriver e Kaufman, 2001). Bowden e McArthur (1972) verificaram que na acidemia fenilpirúvica, o ácido fenilpirúvico inibe a piruvato desidrogenase no cérebro, mas não no fígado. Sugeriram que isto explicaria o defeito na formação da mielina e o retardo mental nesta doença. A maior parte do fenilpiruvato é descarboxilada para produzir fenilacetato ou reduzida para formar fenilactato. O fenilacetato tem um odor tão forte e característico que sua eliminação pela urina foi usado para detectar a PKU em crianças.

A enzima PAH está ativa em hepatócitos e rins humanos. A Phe é incorporada nas proteínas de todos os tecidos, e a conversão deste aminoácido em vários metabólitos também ocorre em outros tecidos além do fígado. Deste modo, os fluxos entre os órgãos são parte integral da rota para este aminoácido e o transporte da Phe através da membrana plasmática antecede a sua entrada nas vias intracelulares. A captação da Phe em células de mamíferos é mediada por transportadores que estão acoplados a um gradiente de Na^+ orientado para o interior dos ápices das membranas dos rins e epitélio intestinal, e por transportadores independentes de Na^+ em outras membranas plasmáticas. A Phe proveniente do plasma e do fluído extracelular entra nas células parenquimatosas através de

um transportador independente de Na^+ , o qual transporta os aminoácidos aromáticos e de cadeia ramificada e sai das células através de um sistema compartilhado pelos aminoácidos de carga neutra. Interações entre os aminoácidos nos transportadores podem perturbar estes fluxos e podem ter um papel na patogênese do fenótipo cerebral em PKU, pois o excesso de Phe pode competir com outros aminoácidos pelo transporte através da barreira hematoencefálica, resultando na depleção de alguns metabólitos destes aminoácidos necessários ao funcionamento cerebral (Scriver e Kaufman, 2001).

A reação de hidroxilação da Phe é uma etapa obrigatória e limitante na via catabólica que leva à completa oxidação da Phe em CO_2 e H_2O . Os produtos cetogênicos (por exemplo: acetoacetato) e gliconeogênicos (por exemplo: fumarato) do catabolismo da Phe contribuem para o conjunto de metabólitos de 2 carbonos e de glicose no organismo. Nesta visão da dependência parcial do cérebro no suprimento periférico de glicose, a habilidade da Phe em prover substratos gliconeogênicos, neste contexto, tem um papel importante na função e desenvolvimento cerebral normal. A hidroxilação da Phe tem outro papel no metabolismo dos mamíferos, provendo o organismo com um suprimento endógeno do aminoácido não essencial, a tirosina. Quando a hidroxilação é deficiente, a tirosina torna-se um aminoácido essencial. O cérebro não contém PAH, mas contém outra enzima, a tirosina hidroxilase, que catalisa a conversão da Phe em tirosina. É provável que a tirosina hidroxilase, agindo sobre a Phe, forneça uma fração significativa da tirosina necessária para a síntese protéica e de outros metabólitos importantes para o funcionamento do cérebro (Scriver e Kaufman, 2001).

A própria Phe provavelmente seja o agente neurotóxico na PKU. Os metabólitos não são encontrados na doença humana (ou de ratos) em concentrações suficientemente altas para serem relacionados com o distúrbio metabólico e químico no cérebro, pois suas

concentrações, por exemplo no fluído cerebrospinal, não têm relação com as usadas para demonstrar os efeitos tóxicos *in vitro* em experimentos animais. Estudos recentes em ratos mutantes para PKU parecem negar a relevância dos metabólitos da Phe (Scriver e Kaufman, 2001).

Clinicamente, a falta de tratamento precoce adequado conduz a um severo retardo mental e psicomotor e, em alguns pacientes, irritabilidade, movimentos despropositados, reflexos diminuídos dos tendões, convulsões, eczema cutâneo, formação deficiente de mielina, microcefalia e vômitos (Berman et al, 1961; Fish et al, 1969; Scriver e Kaufman, 2001). Pacientes afetados pela PKU desenvolvem um variável grau de disfunção neurológica, o qual patologicamente ainda não está claro. O déficit de aprendizagem em pacientes PKU poderia ser devido, ao menos em parte, à produção reduzida de neurotransmissores por um transporte deficiente de tirosina através da barreira hematoencefálica, uma vez que os níveis de tirosina plasmática são baixos em PKU (Hanley et al, 2000). No entanto, os níveis liquóricos de tirosina são altos, pois a Phe é transformada em tirosina no cérebro pela tirosina hidroxilase (Scriver e Kaufman, 2001). A Phe é considerada o principal metabólito neurotóxico acumulado nesta doença, mas os mecanismos de neurotoxicidade parecem ser múltiplos.

O **tratamento** destes pacientes logo após nascimento, usando uma dieta adequada, onde a Phe é estritamente reduzida e é feito um suplemento dietético com uma mistura de aminoácidos livres de Phe pode prevenir o retardo mental. A dieta precisa prover as quantidades de Phe suficientes e necessárias para suprir as necessidades de tirosina e de síntese protéica do organismo. O consumo de alimentos ricos em proteínas precisa ser controlado. Entretanto, mesmo com um tratamento dietético restrito de Phe, os pacientes com PKU clássica ou intermediária podem apresentar um QI baixo (Holtzman et al, 1986,

Smith et al, 1990), défictis neuropsicológicos (Lou et al, 1985; Krause et al, 1985) e anormalidades na matéria branca cerebral (Cleary et al, 1994; Bick et al, 1993). Os mecanismos que provocam este prejuízo cerebral nos pacientes com PKU parecem ser múltiplos e ainda não estão completamente compreendidos.

Trabalhos anteriormente realizados no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo evidenciaram que a Phe reduz a atividade da Na^+, K^+ -ATPase *in vivo* e *in vitro* em membrana plasmática sináptica de córtex cerebral de ratos, e que a alanina previne esta inibição (Wyse et al, 1995; Wyse et al, 1998); a Phe inibe *in vitro* e *in vivo* a fosforilação de proteínas do citoesqueleto de córtex cerebral de ratos e a alanina previne esta inibição (De Freitas et al, 1995; Carreras et al, 2000); Lütz et al (2003) demonstraram que a Phe altera o metabolismo energético em córtex cerebral de ratos, reduzindo a captação de glicose em homogenizado de córtex de ratos, reforçando as observações de que o metabolismo da glicose está reduzido no cérebro de pacientes com PKU (Hasselbach et al, 1996). Juntos, estes dados sugerem que este aminoácido compromete a liberação e armazenamento de energia e/ou sua utilização. Déficits na energia cerebral poderiam explicar as anormalidades na mielinização, na densidade e organização celular, arborização dendrítica e número de espinhas sinápticas encontradas no cérebro de pacientes PKU não tratados (Bauman e Kemper, 1982).

A alanina é um aminoácido nutricionalmente não-essencial sintetizado pela transaminação do piruvato originado da glicose. O transporte da alanina através da barreira hemato-encefálica é mediada, principalmente, pelo sistema A. No cérebro, a alanina é utilizada para a síntese de proteínas, aspartado, glutamato, e glutamina (Balász et al, 1965; Banos et al, 1978).

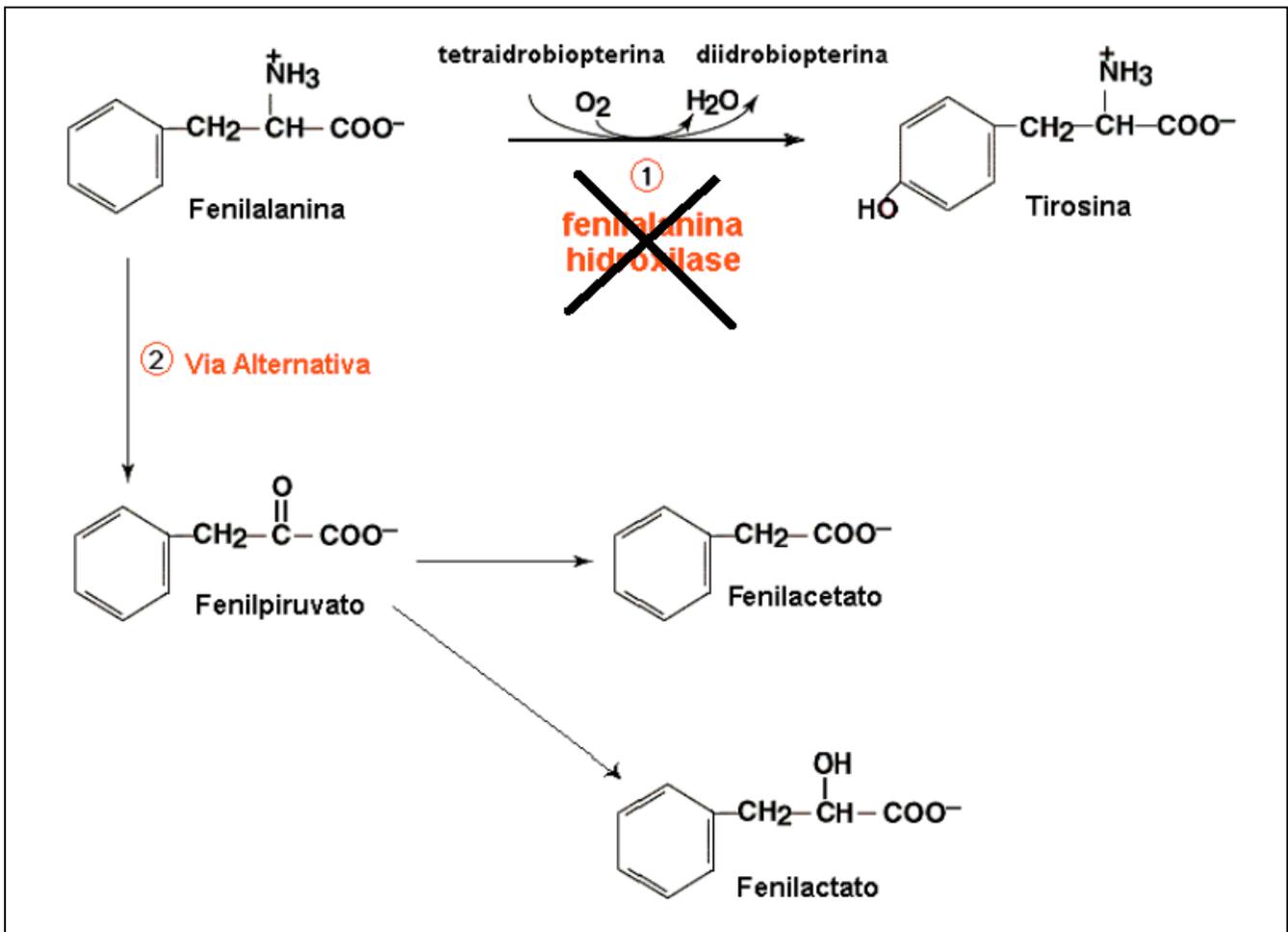


Figura 1: Via principal e uma das vias secundárias de degradação da fenilalanina (adaptado de Scriver e Kaufman, 2001).

3 – Cistinose

3.1 – Conceito e Etiologia (Caracterização)

A cistinose é uma desordem de estocagem autossômica recessiva hereditária rara, devida a um transporte deficiente de cistina, através da membrana lisossomal (Gahl et al, 1982; Jonas et al, 1982). O acúmulo excessivo de cistina dentro dos lisossomos celulares

progride à formação de cristais e por final conduz à morte celular e destruição do tecido (Gahl et al, 2001).

A cistinose é agora reconhecida como uma desordem sistêmica, com sintomas variados para diferentes tecidos afetados, representando um protótipo de desordem metabólica devida a um defeito de integridade na membrana lisossomal no transporte de proteínas (Scriver et al, 2001). A cistinose é causada pela mutação no gene CTNS. O produto do gene CTNS, a cistinosina, é uma proteína que tem 36 aminoácidos e 7 domínios transmembranas e é responsável pelo transporte de cistina para fora dos lisossomos (Anikster et al , 1999). A cistinose presente na infância (*tipo nefropática clássica ou infantil*), com Síndrome de Fanconi tubular renal e retardo no crescimento (Gahl et al, 1986; Krasnewich et al, 1991), apresenta subseqüentes manifestações clínicas que incluem: hipotireoidismo, fotofobia devida ao acúmulo de cristais de cistina na córnea, insuficiência glomerular renal aproximadamente aos 10 anos de idade e, após o transplante renal, a estocagem de cistina pode ocorrer no rim doado em pequena quantidade, mas continua acumulando quantidades crescentes de cistina nos outros tecidos do paciente, resultando em complicações tais como: diabete melito (Gahl et al, 2001), miopatia vacuolar distal (Charnas et al, 1994), hipotireoidismo primário (Chan et al, 1970), dificuldade ao engolir (Sonies et al 1990), insuficiência pancreática (Fivush et al, 1987), hipogonadismo (Chik et al, 1993), prejuízo na função pulmonar (Anikster et al, 2001), e deterioração do sistema nervoso central em um número significativo de transplantados renais dos 13 aos 40 anos de idade (Ehrich et al, 1979; Fink et al, 1989; Gahl et al, 2001). Embora o sistema nervoso central (SNC) também tenha sido considerado poupado na cistinose, isto pode ser verdadeiro somente nas fases iniciais da doença. A estocagem de cistina é limitada em pacientes jovens, mas há o relato de uma mulher de 25 anos de idade que acumulou grandes quantidades de cistina em todas

as estruturas cerebrais (Jonas et al, 1987), e de um homem de 28 anos que apresentava cristais de cistina dentro das células parenquimatosas da substância branca do cérebro (Vogel et al, 1990). As alterações do SNC incluem atrofia cerebral, observada em 3 pacientes com deficiência renal crônica (Whrich et al, 1979); em 7 de 9 pacientes (Brodehl et al, 1984) e 11 de 17 pacientes pós-transplantados (Ehrich et al, 1991); e um grupo de 10 pacientes cistinóticos com sintomas neurológicos tais como: ataques, tremores e retardo mental (Cochat et al, 1986). Atrofia cortical cerebral pode ser ainda observada em pacientes pediátricos com doença renal em fase final (Schnaper et al, 1983). Enquanto muitos pacientes com cistinose seguem o curso nefropático clássico ou infantil descrito acima, pacientes ocasionais exibem a *cistinose intermediária ou adolescente* e não desenvolvem a insuficiência renal antes da segunda ou terceira década de vida (Gahl et al, 1986, 2001). Alguns indivíduos podem apresentar a *cistinose não-nefropática ou ocular* e nunca sofrem doença renal, apresentando somente os sintomas de fotofobia, devidos ao acúmulo de cristais de cistina na córnea (Gahl et al, 1986, 2001). Em geral os pacientes com cistinose nefropática têm de 5 a 23 nmol de cistina/mg proteína em seus leucócitos polimorfonucleares, enquanto aqueles com cistinose intermediária têm de 2 a 5 nmol cistina/mg proteína. Os pacientes com cistinose ocular têm de 1 a 2 nmol cistina/mg proteína (Gahl et al, 2001). Em pacientes com cistinose nefropática, o tratamento precoce com cisteamina (β -mercaptoetilamina), um agente que retira a cistina dos lisossomas (Thoene et al, 1976), retarda a deterioração glomerular renal e auxilia o crescimento (Gahl et al, 1987; Markello et al, 1993). Nos pacientes com depósito ocular de cistina, a cisteamina aplicada como colírio pode dissolver os cristais de cistina na córnea e efetivamente aliviar a fotofobia (Kaiser-Kupfer et al, 1987, 1990).

O gene da cistinose, o *CTNS*, que codifica a cistinosina, (Town et al, 1998), está localizado no cromossomo 17p13 (Cystinosis Collaborative Research Group, 1995), tem 12 exons e produz uma transcrição de 2,6 kb. A mutação mais comum observada entre os Norte-Europeus é uma deleção abrangendo os primeiros 9 exons do *CTNS* (Town et al, 1998; Shotelersuk et al, 1998; Forestier et al, 1999). Em alguns relatos essa deleção foi identificada em 121 de 216 (56%) alelos cistinóticos (Anikster et al, 1999). Já foram identificadas pelo menos 55 mutações diferentes no gene *CTNS* (Town et al, 1998; Shotelersuk et al, 1998; Forestier et al, 1999; Anikster et al, 1999; Mc-Gowan-Jordan et al, 1999), enquanto apenas uma mutação foi identificada em afro-americanos (1209C → G) (Y290X) (Shotelersuk et al, 1998). Isto indica que o diagnóstico naquela população deveria ser considerado apenas naqueles que apresentem os sintomas da doença (Kleta et al, 2001).

Vários diferentes tipos de mutações têm sido relatados, incluindo inserções, pequenas deleções e mutações sem sentido. Cada uma das sete mutações sem sentido relatadas surge da substituição de um aminoácido dentro da região transmembrana ou antes da região transmembrana (Anikster and Shotelersuk et al, 1999). As mutações têm sido nomeadas de acordo com recomendações do sistema de nomenclatura para mutações de genes humanos (Antonarakis et al, 1998).

A incidência da cistinose é de 1:100.000 a 200.000 nascidos vivos.

3.2 – Depósitos de cistina na cistinose

As concentrações de cistina no plasma são normais na cistinose (Seegmiller et al, 1968). A absorção intestinal da cistina é normal, e os níveis de cistina urinária não são mais elevados do que os de outros aminoácidos, diferenciando cistinose de cistinúria. Entretanto,

o depósito de cistina na cistinose é intracelular, com formação de cristais no rim (Spears et al, 1971), cérebro (Ehrich et al, 1979; Fink et al, 1989; Gahl et al, 2001), fígado (Scotto et al, 1977), pulmão (Almond et al, 1993), pâncreas (Fivush et al, 1987), intestino (Holtzapfel et al, 1969; Morecki et al, 1968), conjuntiva e córnea (Cogan et al, 1960), retina (Kaiser-Kupfer et al, 1986), leucócitos polimorfonucleares e monócitos (Korn et al, 1960), músculo esquelético (Gahl et al, 1988) e placenta (Reiss et al, 1988), entre outros.

O acúmulo de cistina e a formação de cristais ocorrem de acordo com a cronologia específica de cada tecido, com considerável variação individual entre pacientes. Cristais na córnea podem estar presentes no primeiro ano de vida, tendo sido identificados em células de Kupffer de feto de 22 semanas (Harnes et al, 1980). As substâncias branca e cinza do cérebro podem ser poupadas do acúmulo de cistina em pacientes jovens com cistinose (Schulman et al, 1971). O depósito no músculo e no fígado aumenta com a idade dos pacientes com cistinose que não receberam terapia de depleção da cistina (Broyer et al, 1981 e Gahl et al, 1992). As razões para a variedade na quantidade de cistina acumulada entre diferentes tecidos são desconhecidas, mas podem estar relacionadas a diferentes índices de degradação de proteínas e turnover da célula. Leucócitos circulantes de pacientes com cistinose mostram morfologia normal e concentrações normais de cisteína (Schneider et al, 1967). Leucócitos polimorfonucleares, células da córnea, células tubulares e epiteliais renais contêm quantidades de cistina de 50 a 100 vezes acima do normal em pacientes com cistinose (Gahl et al, 2001).

Não há relatos publicados de algum heterozigoto para cistinose tendo cristais de cistina em qualquer tecido ou célula, ou exibindo qualquer manifestação clínica de Síndrome de Fanconi renal (Gahl et al, 2001).

O curso clínico e a severidade do acúmulo de cistina na cistinose variam em diferentes famílias (Gahl et al, 2001).

3.3 – Fisiopatogenia

A cistina é considerada usualmente estar acumulada nos lisossomos e isolada do resto da célula. Entretanto, os mecanismos pelos quais a cistina acumulada nos lisossomos causa prejuízo celular e tecidual estão longe de serem compreendidos. Assim, camundongos com ausência de cistinosina apresentam acúmulo de cistina nos lisossomos, mas não desenvolvem síndrome de Fanconi (Cherqui et al, 2002), indicando que só o acúmulo de cistina não é suficiente para causar prejuízo tecidual. Um possível mecanismo patogênico poderia ser a ruptura parcial da membrana lisossomal por cristais de cistina, com ação tóxica da cistina em outros compartimentos celulares, já que a reação positiva para a fosfatase ácida, um marcador de membrana lisossomal, não é encontrada uniformemente na periferia de alguns cristais de cistina (Koizumi et al, 1985). Além disso, observações ultraestruturais em fígado e rim de pacientes com cistinose, e nas biópsias de rins normais transplantados em pacientes cistinóticos, mostraram acúmulo de cistina no citoplasma, núcleo e inclusões citoplasmáticas das células “escuras”, além de depósitos extracelulares, indicando que o armazenamento de cistina pode não estar limitado somente aos lisossomos (Scotto and Stralin, 1977; Spear et al, 1989). Por outro lado, células tubulares renais carregadas com dimetil-ester-cistina desenvolvem síndrome de Fanconi em ratos, secundário a uma diminuição da produção de energia (Ben-Nun et al, 1993; Foreman et al, 1995). Portanto, é concebível que tiol-enzimas citosólicas possam ser inibidas por cistina em pacientes afetados pela cistinose.

Foi relatado por Patrick (1965) a deficiência na atividade de várias enzimas tiólicas, mas não de enzimas não-tiólicas, nos tecidos de fígado e rim após a morte de pacientes com cistinose nefropática. Estas enzimas incluem glicose-6-fosfato desidrogenase, 6-fosfogluconato desidrogenase, hexoquinase, succinato desidrogenase, etanol desidrogenase, e delta-aminolevulinato desidratase. No entanto, é possível que estas enzimas possam ter atividade normal em células intactas e serem inibidas pela cistina liberada pelo rompimento dos lisossomos quando da preparação do tecido para a medida das atividades enzimáticas (Schneider and Schulman, 1983). Considerando que a ruptura do lisossoma com conseqüente morte celular não pode explicar a síndrome de Fanconi na cistinose, porque pacientes com insuficiência renal aguda e crônica por outras causas não apresentam esta síndrome, é importante investigar outros mecanismos que levem à disfunção celular na cistinose. A inibição de tiol-enzimas por cistina pode ser um destes mecanismos.

3.4 – Diagnóstico

O diagnóstico é feito pela demonstração de um conteúdo elevado de cistina em leucócitos polimorfonucleares ou cultura de fibroblastos ou por um exame oftalmológico com lâmpada de fenda, mostrando cristais na córnea, geralmente em pacientes acima de 1 ano de idade. A cistinose pode ser diagnosticada no útero pela medida da cistina nas células do líquido amniótico, ou após o nascimento pela medida da cistina na placenta (Gahl et al, 2001).

3.5 – Tratamento

A terapia para cistinose inclui transplante renal entre 6-12 anos de idade, fornecimento de tiroxina, insulina, enzimas pancreáticas e testosterona para pacientes deficientes e

cuidados com complicações oftálmicas. A terapia de depleção de cistina com o aminotiol cisteamina, baixa significativamente os níveis de cistina dos leucócitos e proporciona uma recuperação do crescimento. O mais importante da terapia de cisteamina oral é que preserva a função renal. Quando iniciada nos 2 primeiros anos de vida, pode permitir, inclusive, um aumento nos índices de filtração glomerular. Gotas de cisteamina para os olhos podem dissolver os cristais da córnea em crianças jovens e melhorar o enevoado das córneas de pacientes mais velhos (Gahl et al, 2001).

3.6 – Mecanismo de depleção da cistina pela cisteamina

A cisteamina ou β -mercaptoetilamina é um aminotiol que, em 1976, foi demonstrado reduzir rápida e extensivamente o conteúdo de cistina de fibroblastos cistinóticos (Thoene et al, 1976). Foi sugerido que a cisteamina reagia com a cistina para formar cisteína e um composto dissulfeto de cisteína-cisteamina. A cisteína saíria livremente dos lisossomos cistinóticos (Gahl e Tietze et al, 1982), possivelmente via um carregador de membrana específico lisossomal (Pisoni et al, 1990). O composto cisteína-cisteamina também saíria do lisossomo por ter uma pequena massa molecular menor do que 220 daltons, o limite máximo aceito para o movimento livre de aminoácidos e di- e tripeptídios através da membrana lisossomal (Ehrenreich et al, 1969). Trabalhos subsequentes mostraram que o composto cisteína-cisteamina, por ter semelhança estrutural com a lisina, era transportada através das membranas lisossomais cistinóticas mediada pelo transportador da lisina, o qual estava intacto nos fibroblastos cistinóticos (Pisoni et al, 1985). De fato, experimentos em leucócitos demonstraram que o composto cisteína-cisteamina era retirado em quantidades significativas dos depósitos cistinóticos, ao contrário da cistina, a qual permanecia dentro

dos lisossomos (Gahl et al, 1985). Portanto, para a depleção da cistina de lisossomas cistinóticos são utilizados transportadores específicos para a entrada da cisteamina (Pisoni et al, 1995), saída do complexo cisteína-cisteamina via sistema de transporte da lisina, e saída da cisteína, o outro produto da reação intralisossomal, provavelmente por um sistema de transporte próprio (Pisoni et al, 1990).

O modo na qual a cisteamina é capaz de entrar nos lisossomos, entretanto, não foi determinado. Estudos feitos por Pisone et al (1990), sugerem que a cisteamina é reconhecida pelo sistema de transporte lisossomal de cisteína. Portanto, são necessários estudos futuros para investigar se o sistema de transporte lisossomal específico para cisteína tem uma importante função na entrega de cisteamina para o compartimento lisossomal e permitir uma compreensão mais completa da base da terapia com cisteamina no tratamento da cistinose (Pisone et al, 1990) (Figura 2).

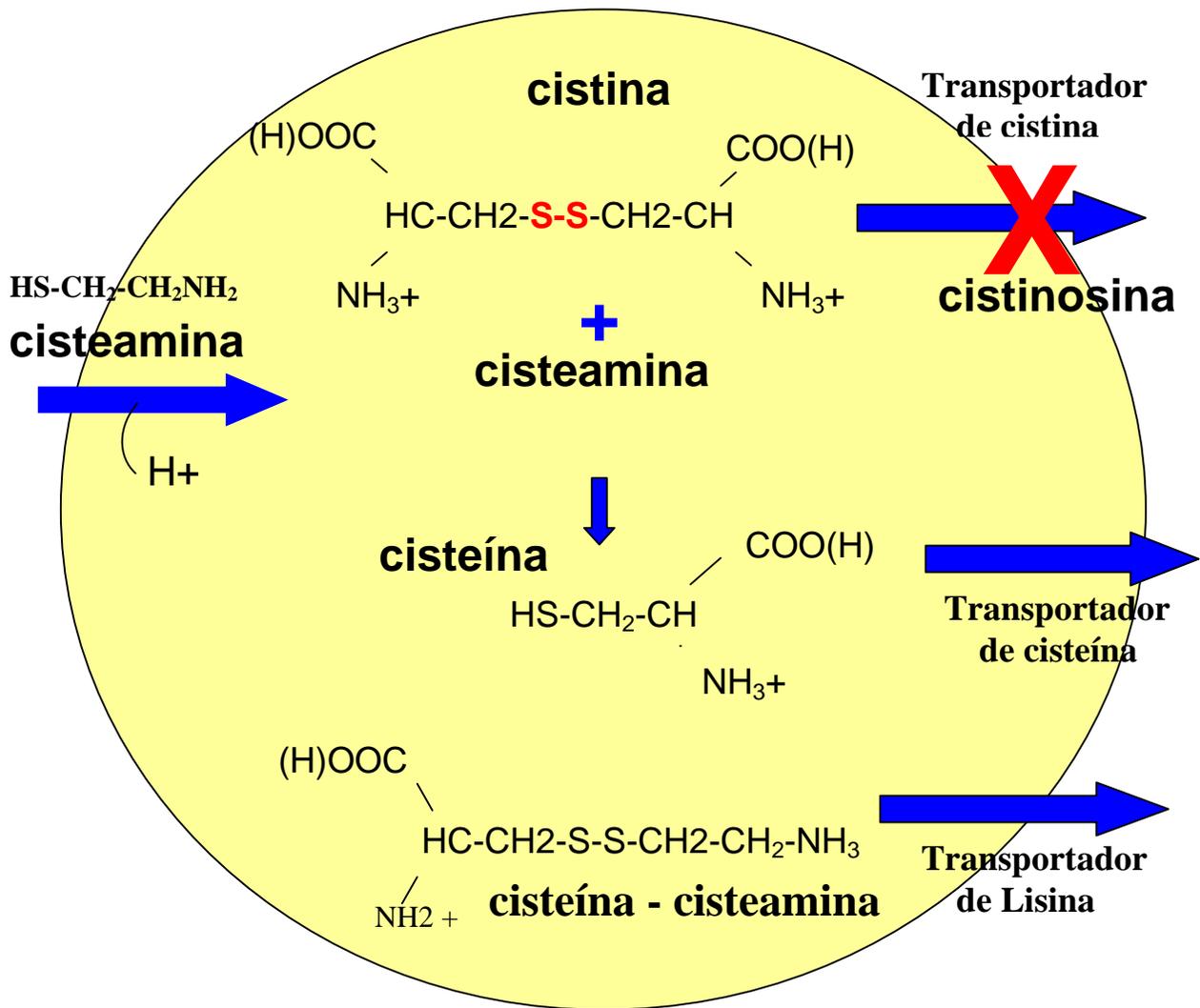


Figura 2: Mecanismo de depleção da cistina-cisteamina.(Scriver e Kaufman, 2001).

3.7 – Sistema de transporte Lisossomal Específico de Cisteína – Cistina

Sugerido por Pisone et al (1990)

Os lisossomos são um dos maiores sitios celulares para a degradação de uma ampla variedade de macromoléculas, contendo um amplo repertório de atividades enzimáticas.

Essas macromoléculas são entregues para esta organela por receptores mediados por endocitose, pinocitose e autofagia. Muitos dos metabólitos formados no lisossomo como uma consequência da quebra de macromoléculas, saem do compartimento lisossomal através de um sistema de transporte mediado por carregadores. Sistemas de transporte lisossomal específicos para cistina (Gahl et al, 1982; *Gahl et al, 1982; Gahl et al, 1983; Jonas et al, 1982), aminoácidos catiônicos (Pisone et al, 1985; *Pisone et al, 1987), aminoácidos neutros pequenos (Pisone et al, 1987), aminoácidos neutros grandes (Bernar et al, 1986; Tietze et al, 1989), nucleosídeos (Pisone et al, 1989) entre outros, têm sido descritos. A importância do sistema de transporte mediando o escape de metabólitos do compartimento lisossomal torna-se especialmente óbvio na doença genética letal, cistinose nefropática. Nos últimos 10 anos, vários investigadores têm apontado para a função de tióis no estímulo da degradação lisossomal de proteínas ricas em dissulfetos. Kooistra et al (1982) encontraram uma variedade de tióis que foram capazes de estimular enzimas lisossomais purificadas que poderiam degradar proteínas. Estes autores postularam que 2 processos de proteólise e redução de pontes dissulfídicas agem sinergicamente para facilitar a degradação lisossomal de proteínas. Primeiro, tióis ativam as enzimas lisossomais tióis- dependentes e segundo, tióis reduzem pontes dissulfídicas das proteínas permitindo que as proteínas desenrolem-se, proporcionando que as proteinases tenham acesso a ligações suscetíveis do substrato. Subseqüentemente, Mego et al (1984) demonstraram que a cisteína acelerava o índice de proteólise intralisossomal de proteínas ricas em dissulfetos em lisossomas de rim de camundongo. Lloyd et al (1986) postularam que a cisteína do citoplasma pode ser o agente fisiológico responsável pela redução intralisossomal das proteínas dissulfídicas.

Pisone et al (1990) demonstraram que um sistema de transporte lisossomal, altamente específico para cisteína, proporciona a maior rota de entrega de cisteína para o compartimento lisossomal. Metade da cistina lisossomal nos fibroblastos cistinóticos ou normais são seqüestrados como cisteína dentro dos lisossomas (Elferink et al, 1983).

A permuta entre cistina e cisteína dentro do fibroblasto parece ser um processo cíclico. A cistina é transportada através da membrana plasmática para dentro do citosol pelo sistema de transporte X^-_{CG} (Bannai et al, 1986; Bannai et al, 1988). Ao entrar no citosol, a cistina é reduzida pela GSH para formar cisteína. Embora baixos níveis deste produto tenham sido observados nos fibroblastos (Bannai et al, 1980; Schulman et al, 1973), a maioria da mistura dissulfídica de glutatona e cisteína parece ser metabolizada por outros constituintes celulares, possivelmente por enzimas (Chang et al, 1966; Eriksson et al, 1970; Tietze et al, 1973). A cisteína formada no citosol pode ser transportada para o espaço extracelular, onde é reoxidada para formar cistina (Bannai et al, 1988). A cisteína citosólica pode também ser usada para a síntese de glutatona e proteínas, metabolizada para a produção de outros constituintes celulares, ou, assim como foi mostrado por Pisone et al (1990), seqüestrada dentro do compartimento lisossomal pelo sistema de transporte lisossomal específico para cisteína para ajudar na proteólise lisossomal. Assim, dentro do compartimento lisossomal, a cisteína pode reagir com as pontes dissulfídicas das proteínas, como sugerido por Lloyd et al (1986), liberando dentro do lisossoma cistina e cisteína livres após a proteólise. Esta cistina formada no lisossomo é transportada do lisossoma para o citosol pelo sistema de transporte lisossomal de cistina. Ao alcançar o citosol, a cistina é reduzida novamente à cisteína pela GSH. A produção de cistina lisossomal originada da cisteína ocorre por este mecanismo. Na observação de Thoene e seus colaboradores (Thoene et al, 1980; Thoene et al, 1982; Thoene et al, 1977), o acúmulo de cistina em

fibroblastos cistinóticos vem da degradação de proteínas ricas em dissulfetos, mas não da degradação de proteínas ricas em cisteína.

Esta rota de transporte específico para cisteína pode ter uma função importante para manter a proteólise lisossomal, por proporcionar tióis para as proteases lisossomais dependentes de tióis e por reduzir pontes dissulfídicas de proteínas, permitindo que estas proteínas desenrolem-se, facilitando a degradação delas (Pisone et al, 1990) (Figura 3).

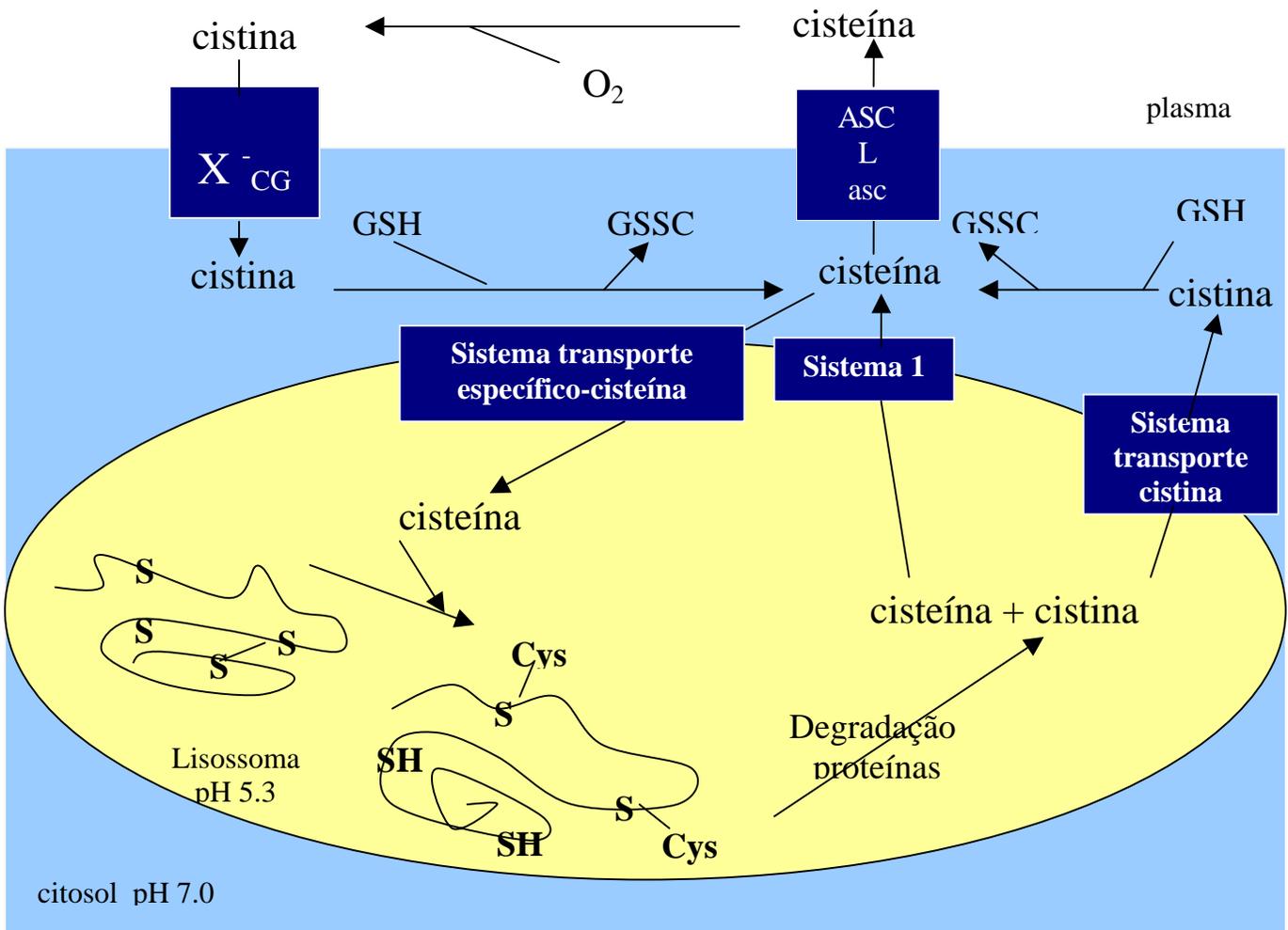


Figura 3: Sistema de transporte Lisossomal Específico de Cisteína – Cistina

4 – Hipertriptofanemia

4.1 – Conceito e Etiologia (Caracterização)

Hipertriptofanemia é uma desordem metabólica rara, provavelmente causada por um bloqueio na conversão do triptofano a quinurenina, acumulando triptofano e alguns de seus metabólitos no plasma e tecidos dos pacientes. Os pacientes apresentam retardo mental leve a moderado, com respostas afetivas exageradas, mudanças periódicas de humor, comportamento hipersexual, ataxia, erosões cutâneas hipersensíveis e retardo no crescimento (Martin et al, 1995).

Triptofano, um aminoácido essencial, é convertido a vários compostos, chamados quinureninas (formil-quinurenina, quinurenina e 3-hidroxi-quinurenina), serotonina, ácidos indólicos (ácido indolpirúvico, ácido indolacético, ácido 5-hidróxi-indolacético e indolacetil-glutamina) e componentes do ácido nicotínico (niacina) (nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e nicotinamida). Sob condições normais, muito pouco triptofano parece ser convertido a ácido nicotínico (Levy, 2001).

Defeitos congênitos do metabolismo do triptofano são raros (Snedden, et al, 1983), embora menos de 12 pacientes com aparente defeito no catabolismo do triptofano tenham sido relatados (Levy et al, 2001). Tada et al (1963) descreveram o caso de uma menina de 9 anos de idade caracterizada por nanismo, dano mental, erupções cutâneas fotosensíveis e ataxia. Esta paciente apresentava níveis moderadamente elevados de triptofano na urina e no plasma, e excessiva excreção de ácido indolacético (IAA).

Snedden et al (1983) primeiramente descreveram 2 pacientes irmãos que tinham níveis de triptofano aumentado e quinurenina reduzida no plasma e na urina. O irmão de 23 anos de idade apresentava dores generalizadas nas articulações, instabilidade emocional, visão

defeituosa, gagueira e hipersexualidade. A avaliação neuropsicológica realizada demonstrou mudanças rápidas no estado de humor, QI de 75 na avaliação verbal e QI de 86 na avaliação em testes de memória, sugerindo problemas de armazenamento e processamento de informações. O comportamento da irmã com 22 anos de idade, assim como o do irmão, foi caracterizado por mudanças abruptas no estado de humor, variando completamente do estado alegre e afetivo a hostil e depressivo, e comportamento hipersexual. Exame psiquiátrico indicou moderado retardo mental. O triptofano encontrava-se bastante elevado na urina e no plasma (10 vezes acima do normal).

Retardo mental leve a moderado com exageradas respostas afetivas, mudanças periódicas de humor, e aparente comportamento hipersexual foram posteriormente relatados nestes dois irmãos (Martin et al, 1995). Os níveis plasmáticos de triptofano continuavam 10 vezes maiores do que os dos controles, e a excreção urinária de ácidos indólicos foram 100 vezes maior que o normal. A excreção massiva de ácidos indolacético, indolático e indolpirúvico indicaram grandes quantidades anormais de triptofano sendo metabolizados pela rota de transaminação (Snedden et al, 1983). A ocorrência nos irmãos e a presença anormal de metabólitos do triptofano na urina da mãe deles e do meio irmão, sugerem uma condição de um gene autossômico recessivo com menor expressão em alguns heterozigotos. A coincidência do retardo mental, oscilações bizarras no afeto e aparente hipersexualidade nestes 2 irmãos, que mostraram hipertriptofanemia e hipertriptofanúria, sugerem que os problemas comportamentais resultam de um defeito bioquímico. Eles sugeriram um bloqueio na conversão inicial do triptofano a quinurenina, mas estudos enzimáticos não foram feitos (Snedden et al, 1983).

Os níveis elevados do triptofano no plasma e a presença de diferentes manifestações clínicas dos dois irmãos afetados, distinguem-os da Doença de Harnup e de outros distúrbios

do metabolismo do triptofano congênitos ou adquiridos relatados (Tada et al, 1963; Wong et al, 1976; Levy et al, 1979; Knapp et al, 1960; Price et al, 1967, Kromrower et al, 1964; Drumond et al, 1964; Shulman et al, 1990; Silver et al, 1992). Os achados bioquímicos destes dois irmãos fortemente sugerem um bloqueio na conversão inicial do triptofano a quinurenina tanto quanto um defeito no transporte. O bloqueio poderia envolver tanto a oxidação do triptofano a formil-quinurenina ou a clivagem de formil-quinurenina a quinurenina. A excreção massiva dos ácidos indolacético, indolático e indolpirúvico indicam que grandes quantidades de triptofano estão sendo metabolizadas pela rota de transaminação. Isto deveria aumentar a conversão do triptofano para serotonina, explicando o aumento observado na excreção do ácido 5-hidróxi-indolacético.

A serotonina (5-hidroxi-triptamina), é um neurotransmissor monoamino, é um importante derivado do triptofano, embora pouco triptofano seja catabolizado nesta direção. A serotonina é usualmente avaliada na urina ou fluido cérebro-espinhal, por meio de seu produto de oxidação, o ácido 5-hidróxi-indolacético (5-HIAA) (Gahl et al, 2001).

A elevação pronunciada do triptofano e dos componentes relatados nestes dois pacientes, e também elevações moderadas anormais de metabólitos do triptofano na urina da mãe deles e de um meio-irmão, e outros meio-irmãos mostrando valores normais, sugerem que o erro do metabolismo do triptofano seja devido a um gene mutante com efeitos severos nos homozigotos e efeitos moderados em alguns heterozigotos (Snedden et al, 1983).

4.2 – Metabolismo do Triptofano

O ácido nicotínico ou nicotinamida (NAD⁺) pode ser sintetizado a partir do triptofano. O triptofano é primeiramente convertido em formilquinurenina pela enzima hepática

Triptofano pirrolase, cuja atividade é estimulada pela administração de triptofano ou de glicocorticóides (Feigelson et al, 1962; Schimke et al, 1965). A formilquinurenina é hidrolisada a quinurenina pela enzima hepática quinurenina formilase. A quinurenina é hidroxilada a 3-hidróxi-quinurenina pela enzima mitocondrial *quinurenina 3-hidroxilase* e após ocorre a formação do ácido nicotínico, o qual é então metabolizado a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) e nicotinamida. Sob condições normais, pequenas quantidades de triptofano são convertidas a ácido nicotínico. Entretanto, o triptofano pode ser uma importante fonte de niacina, particularmente em indivíduos com uma dieta protéica relativamente pobre (Goldsmith et al, 1964). Evidências de que o triptofano seja uma importante fonte de niacina é observado em pacientes suspeitos de terem um defeito na degradação do triptofano. Fatores clínicos comuns em vários destes pacientes têm incluído características de deficiência de niacina tais como erupções cutâneas fotosensíveis, ataxia e anormalidade mental (Tada et al, 1963; Fenton et al, 1983). Estes pacientes também apresentam freqüentemente excreção urinária reduzida de N-metil-nicotinamida (Tada et al, 1963; Salih et al, 1985; Fenton et al, 1983), indicando que o bloqueio na degradação do triptofano limitou a síntese do ácido nicotínico.

Outra rota do metabolismo do triptofano é a sua conversão a ácidos indólicos. O ácido indolacético é um produto do metabolismo realizado por microorganismos intestinais e tecidos de mamíferos (Weissbach et al, 1959). Esta conversão ocorre principalmente pela transaminação do triptofano a ácido indol-pirúvico, com subsequente descarboxilação a ácido indolacético. Pequenas quantidades de triptofano são também convertidas em ácido indolacético pela rota de triptamina.

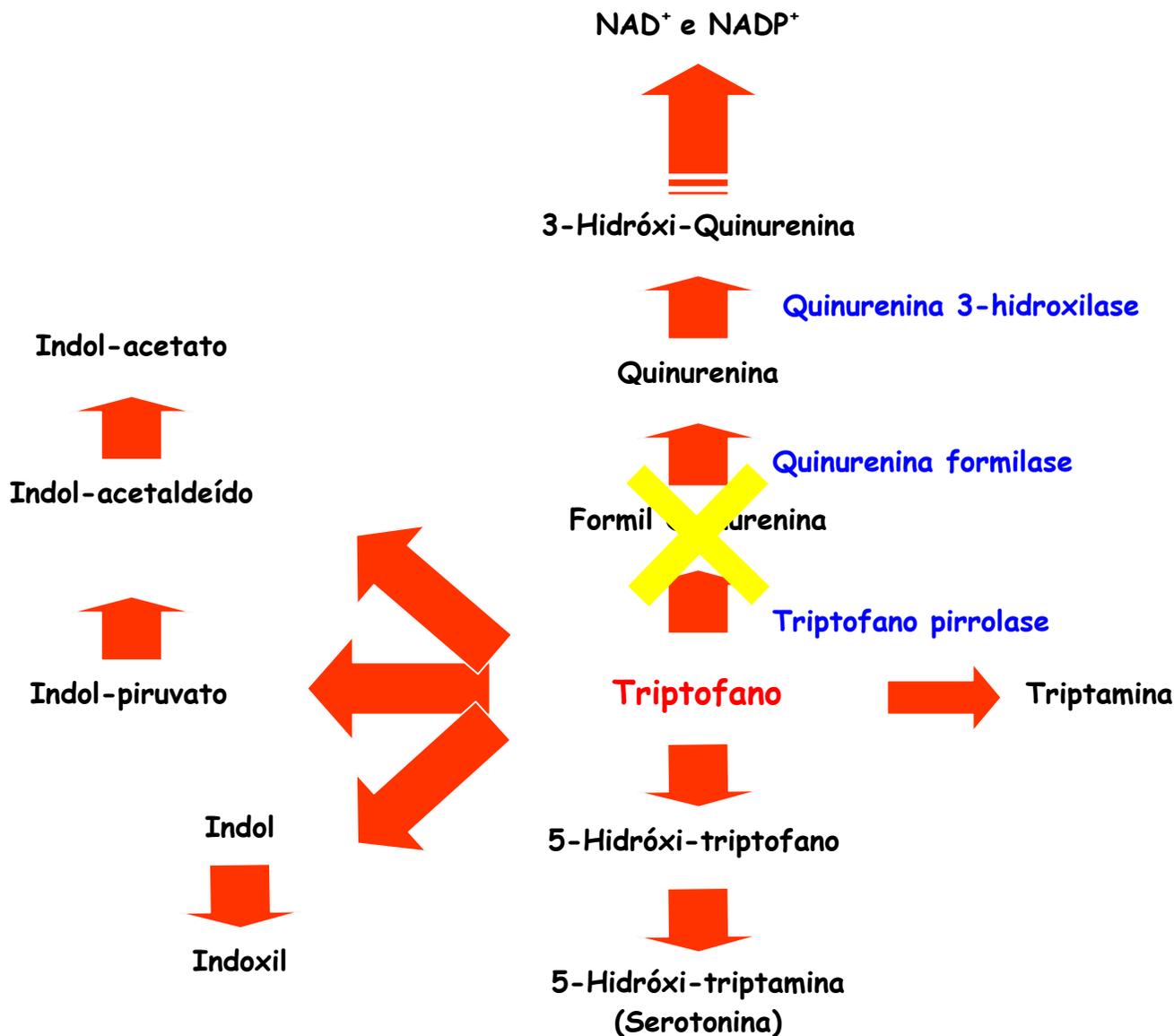


Figura 4: Metabolismo do triptofano.

5- Piruvatoquinase

A manutenção do fluxo de energia e de nutrientes para dentro da célula é essencial para a homeostasia e o funcionamento celular. A principal via de liberação de energia na célula nervosa é a rota glicolítica, cuja regulação está primariamente associada com 2 enzimas alostéricas: a fosfofrutoquinase e a piruvatoquinase, a qual cataliza a transferência de fosfato do fosfoenolpiruvato (PEP) para o ADP.

PK



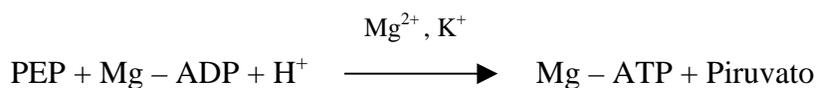
A piruvatoquinase de mamíferos é uma enzima homo-tetrâmera e cada subunidade (monômero) consiste de 4 domínios (A, B, C e N), cada um possuindo um sítio ativo. A atividade catalítica desta enzima foi proposta ser ativada por um aperto ou fechamento do domínio B (resíduos 116-218) sobre o domínio A (resíduos 43-115 e 219-387), desidratando a fenda intercedente que torna o sítio ativo (Consler et al, 1988; Mattevi et al, 1996). A função dos outros domínios, C (resíduos 388-530) e N (resíduos 1-42) são bem menos caracterizados (Figura 5).

Nos mamíferos há 4 isoenzimas da piruvatoquinase. Estas formas de isoenzimas diferem em suas propriedades químicas, físicas, cinéticas, eletroforéticas e imunológicas, bem como na distribuição nos tecidos: A isoenzima tipo M1 é o principal tipo nos tecidos especialmente diferenciados, tais como músculo esquelético, coração e cérebro adulto. O tipo L é predominante em tecidos gliconeogênicos, especialmente no fígado, onde se constitui no maior componente, e no rim, onde é o menor componente (Hakin et al, 1976; Staal et al, 1985). O tipo R está presente nos eritrócitos e tecidos hematopoiéticos. O tipo M2 (ou A ou K) é predominante no feto, em neoplasias e tecidos não diferenciados e em proliferação, mas é também fracamente distribuído em tecidos adultos. A M2 está em menor quantidade no fígado e em maior quantidade no rim (Dabrowska et al, 1998). Esta forma de isoenzima tipo M2 é progressivamente substituída pelo tipo M1 em músculo esquelético, coração e cérebro durante o desenvolvimento. A isoenzima tipo M1 foi considerada por muito tempo ser diferente das outras formas em suas propriedades

enzimáticas, não sendo regulada alostéricamente, mostrando cinética hiperbólica e não sendo ativada pela frutose-1,6-bifosfato (FBP). A isoenzima tipo M2 mostra uma cinética sigmoidal com respeito ao fosfoenolpiruvato (PEP) e é ativada pela FBP (Friesen et al, 1998). Os tipos M1 e M2 são produzidas do mesmo gene por uma junção alternativa, e o tipo R e L são produzidas por um só gene pelo uso de diferentes promotores (Dabrowska et al, 1998).

Estudos prévios sobre a isoenzima tipo M1 da PK sugerem que o comportamento regulatório pode ser descrito por um modelo em que a enzima se apresenta em 2 estados (Monod et al, 1965): Este modelo propõe uma forma ativa (R) e uma forma inativa (T) da PK com afinidade diferencial para ligantes. A ligação do inibidor fenilalanina à PK-M1 produz uma mudança estrutural da PK (Oberfelder et al, 1984). A enzima ligada à fenilalanina exibe uma afinidade reduzida para com o substrato PEP. Estas observações são consistentes com uma transição R (ativa) → T (inativa) induzida pela ligação da fenilalanina (Consler et al, 1989; Consler et al, 1992; Heyduk et al, 1992). No sistema M2, a transição entre a forma R → T é mais pronunciada. É possível que a subunidade inteira participe da regulação da atividade enzimática, e que a comunicação entre sítios de ligação possa ocorrer por uma mudança de estados conformacionais (Pan et al, 2000; Wooll et al, 2001).

A etapa final no curso glicolítico é a conversão do PEP a piruvato com a síntese de ATP:



A reação é catalizada pela piruvatoquinase (PK), a qual requer, para sua atividade, cátions monovalente e divalente. A PK é tipicamente uma enzima alostérica e participa com uma maior função no controle do fluxo metabólico da frutose-1,6-bifosfato (FBP) a piruvato, o qual está envolvido em uma variedade de rotas metabólicas, indicando que a PK pode ser considerada uma enzima chave não somente para a rota glicolítica, mas também para o metabolismo celular (Mattevi et al, 1996).

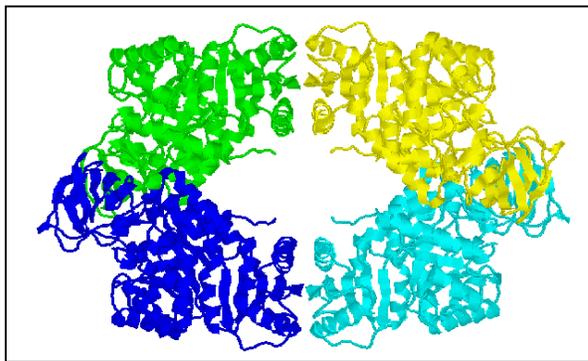


Figura 5: Piruvatoquinase de mamíferos é homo-tetrâmera, e cada subunidade (monômero) consiste de 4 domínios (A, B, C e N), cada um possuindo um sítio ativo.

6- Alguns Aspectos do Metabolismo de Carboidratos no Cérebro

A glicose é o maior nutriente para as células nervosas, que dependem de sua disponibilidade. O sistema nervoso é o mais vulnerável em relação a uma grande queda na concentração de glicose no sangue. Assim como no caso de muitos órgãos, a disponibilidade de glicose para o cérebro depende de um suprimento proveniente do sangue (Hevor et al, 1994).

A glicose é trazida para o cérebro pelo sangue através das artérias e é rapidamente catabolizada pela rota glicolítica e ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs) para liberar

e armazenar energia. A glicose também é usada para a síntese de numerosos aminoácidos, nucleotídeos e NADPH, podendo ser polimerizada a glicogênio no cérebro (Hevor et al, 1994).

O tecido nervoso é capaz de sintetizar glicose-6-fosfato na rota gliconeogênica, a partir da frutose-1,6-bifosfato, utilizando uma fosfatase que se acreditava estar ausente, e atualmente sabe-se que está ativa, tendo sido purificada (Hevor et al, 1994). Entretanto, existe a possibilidade de síntese de glicose livre pelos astrócitos. Embora a exata função do glicogênio no cérebro não seja ainda totalmente esclarecida, sabe-se que o conteúdo do polissacarídeo (glicogênio) geralmente diminui quando o funcionamento do cérebro é estimulado e aumenta em estado de sedação. Este carboidrato pode, portanto, servir como um indicador do nível de atividade cerebral. Tem sido mostrado em cultura de astrócitos que o glutamato aumenta a síntese de glicogênio utilizando uma rota ainda não elucidada. O metabolismo de carboidratos no cérebro é similar ao metabolismo de carboidratos no fígado. O astrócito constitui a principal célula implicada neste metabolismo, pois a enzima gliconeogênica, a frutose-1,6-bifosfatase está localizada somente no astrócito e o glicogênio pode estar concentrado nesta célula (Hevor et al, 1994).

Uma propriedade importante do metabolismo do cérebro reside na grande quantidade de glicose que o cérebro consome comparada com seu relativo peso. O cérebro pesa aproximadamente 2,5 % do total do peso corporal e consome 15 % da quantidade total da glicose consumida pelo corpo e 20 % do oxigênio consumido (Keele et al, 1982).

O uso da glicose para liberação de energia e síntese de ATP é bastante óbvio. Um dos principais fatores do metabolismo cerebral é a rapidez com que o carbono da glicose é rapidamente incorporado, *in vivo* ou *in vitro*, dentro de muitos aminoácidos, e a rapidez com que a glicose entra em muitos compartimentos metabólicos (Nehling et al, 1978;

Gaitone et al, 1965). Isto significa que o cérebro não somente cataboliza glicose para sua energia, mas também para suas necessidades plásticas. A glicose é também usada para outras rotas no cérebro. Em muitos mamíferos adultos e pássaros, cerca de 8 % da glicose utilizada pelo sistema nervoso segue a rota pentose-fosfato para suprir o tecido com um componente reduzido, o NADPH e outros componentes úteis para a síntese de material nuclear (Hosteler et al, 1970; Hakin et al, 1976). Estas investigações têm mostrado que a rota pentose-fosfato pode usar mais de 35 % da glicose durante períodos de hipóxia e que a rota pentose-fosfato tem uma importante função na embriogênese. O tecido nervoso, portanto, consome glicose com o propósito de liberar e armazenar energia, sintetizar várias proteínas e ácidos nucleicos. Junto a estas rotas catabólicas, a glicose segue também uma rota anabólica no cérebro. Como no fígado, o cérebro é capaz de sintetizar glicogênio usando a glicogênio sintetase. Entretanto, o glicogênio tem um alto “turnover“ no cérebro comparado com outros órgãos (Bachelard et al, 1978). A função do glicogênio como um reservatório para o cérebro é duvidosa e sua utilidade não é ainda clara. Dada a importância do consumo de glicose no tecido cerebral, teoricamente, seria interessante aumentar a quantidade de glicogênio no cérebro. Observações recentes têm mostrado que o aumento de carboidratos no cérebro protege contra infarto do tecido nervoso (Swanson et al, 1990). Devido à baixa concentração de glicogênio no cérebro normal, partículas de glicogênio não são claramente visíveis em microscópio eletrônico, diferentemente do fígado (Drochmans et al, 1962).

Os principais substratos energéticos que entram no cérebro são a glicose e O_2 , e os principais produtos liberados são CO_2 e H_2O . Admite-se que uma porção substancial de energia liberada no cérebro vem da conversão de glicose a lactato, e da oxidação do lactato (Adelbert Ames, 2000). Isoenzimas da lactato desidrogenase, contendo subunidades da

LDH5, que favorece a conversão do piruvato ao lactato, são amplamente distribuídos no cérebro, particularmente na glia (Bittar et al, 1996; Tholey et al, 1981; Venkov et al, 1976). Isoenzimas da lactato desidrogenase contendo subunidades da LDH-1, que favorece a transformação do lactato a piruvato, são encontradas em ambos, neurônio e glia (Bittar et al, 1996; Tholey et al, 1981). O lactato é transportado para o sistema nervoso central (SNC) através das membranas plasmáticas, incluindo a barreira hemato-encefálica, pelo transportador monocarboxílico (Bröer et al, 1997; Gerhart et al, 1997; Pellerin et al, 1998; Poole et al, 1993). Um aumento significativo nas concentrações de lactato no cérebro tem sido observado – acima de 50% - em resposta a vários tipos de estímulos fisiológicos (De Bruin et al, 1990; Prichard et al, 1991; Sappey-Marinié et al, 1992).

II. Objetivos

Considerando que os mecanismos bioquímicos envolvidos na gênese da disfunção neurológica presente na fenilcetonúria, hipertriptofanemia e cistinose são pouco conhecidos e que a fenilalanina, triptofano e cistina apresentam efeitos neurotóxicos, esse trabalho teve como objetivos:

1. Determinar a atividade da piruvatoquinase em córtex cerebral de ratos submetidos à hiperfenilalaninemia aguda e crônica e investigar o efeito da administração da alanina sobre a atividade da piruvatoquinase nestes ratos tratados;
2. Realizar estudos cinéticos da inibição da piruvatoquinase provocada pela fenilalanina e seu principal metabólito, o fenilpiruvato, em homogenizado livre de mitocôndrias de córtex cerebral de ratos Wistar de 22 dias de vida;
3. Investigar o efeito *in vitro* da cistina sobre a atividade da piruvatoquinase em homogenizado livre de mitocôndrias de córtex cerebral de ratos Wistar de 22 dias de vida e caracterizar cineticamente o tipo de inibição;
4. Determinar o efeito *in vivo* e *in vitro* do triptofano sobre a atividade da PK em córtex cerebral de ratos, e o efeito da alanina sobre a inibição *in vitro* e *in vivo*;
5. Realizar estudos cinéticos da interação entre os aminoácidos fenilalanina, triptofano, cistina, alanina e serina sobre a atividade da piruvatoquinase em homogenizado livre de mitocôndrias de córtex cerebral de ratos Wistar de 22 dias de vida;

III. Resultados

Objetivo 1 - Investigar os efeitos in vitro e in vivo da fenilalanina e da alanina sobre a atividade da piruvatoquinase em córtex cerebral de ratos.

Artigo 1

Alanina previne a redução da atividade da piruvatoquinase em córtex cerebral de ratos submetidos à hiperfenilalaninemia induzida quimicamente.

Alanine prevents the reduction of pyruvate kinase activity in brain cortex of rats subjected to chemically induced hyperphenylalaninemia.

Luciane Rosa Feksa, Andrea Renata Cornelio, Virginia Cielo Rech, Carlos Severo Dutra-Filho, Angela Terezinha de Souza Wyse, Moacir Wajner, Clóvis Milton Duval Wannmacher. *Neurochemical Research*, 27: 947 – 952 (2002).

Objetivo 2 - Realizar estudos cinéticos da inibição da piruvatoquinase provocada pela fenilalanina e seu principal metabólito, o fenilpiruvato, em homogenizado livre de mitocôndrias de córtex cerebral de ratos Wistar de 22 dias de vida;

Artigo 2

Caracterização da inibição da piruvatoquinase causada pela fenilalanina e fenilpiruvato em córtex cerebral de ratos.

Characterization of the inhibition of pyruvate kinase caused by phenylalanine e phenylpyruvate in rat brain cortex.

Luciane Rosa Feksa, Andrea Renata Cornelio, Carlos Severo Dutra-Filho, Angela Terezinha de Souza Wyse, Moacir Wajner, Clóvis Milton Duval Wannmacher. **Brain Research, 968: 199 – 205. (2003).**

Objetivo 3 - Investigar o efeito in vitro da cistina sobre a atividade da piruvatoquinase em homogenizado livre de mitocôndrias de córtex cerebral de ratos Wistar de 22 dias de vida e caracterizar cineticamente o tipo de inibição.

Artigo 3

Inibição da atividade da piruvatoquinase pela cistina em córtex cerebral de ratos.

Inhibition of pyruvate kinase activity by cystine in brain córtex of rats.

Luciane Rosa Feksa, Andrea Renata Cornelio, Carlos Severo Dutra-Filho, Angela Terezinha de Souza Wyse, Moacir Wajner, Clóvis Milton Duval Wannmacher. **Brain Research**, 1012: 93 – 100 (2004).

Objetivo 4 - Determinar o efeito in vivo e in vitro do triptofano sobre a atividade da PK em córtex cerebral de ratos, e o efeito da alanina sobre a inibição in vitro e in vivo.

Artigo 4

Alanina previne a inibição da atividade da pituvatoquinase causada pelo triptofano em córtex cerebral de ratos.

Alanine prevents the inhibition of pyruvate kinase activity caused by tryptophan in cerebral córtex of rats.

Luciane Rosa Feksa, Andrea Renata Cornelio, Carmem Regla Vargas, Carlos Severo Dutra-Filho, Angela Terezinha de Souza Wyse, Moacir Wajner, Clóvis Milton Duval Wannmacher. *Metabolic Brain Disease*, **18: 129 – 137 (2003).**

Objetivo 5 - Realizar estudos cinéticos da interação entre os aminoácidos fenilalanina, triptofano, cistina, alanina e serina sobre a atividade da piruvatoquinase em homogenizado livre de mitocôndrias de córtex cerebral de ratos Wistar de 22 dias de vida.

Artigo 5

Cinética de interação entre aminoácidos sobre a atividade da piruvatoquinase de córtex cerebral de ratos em desenvolvimento.

Kinetics of the interaction between amino acids on pyruvate kinase activity from brain córtex of developing rats.

Luciane Rosa Feksa, Andrea Renata Cornelio, Carlos Severo Dutra-Filho, Angela Terezinha de Souza Wyse, Moacir Wajner, Clóvis Milton Duval Wannmacher. **Submetido ao International Journal of Developmental Neuroscience**

IV. Discussão

Nosso trabalho constituiu-se no estudo dos efeitos dos principais metabólitos acumulados na fenilcetonúria (hiperfenilalaninemia), na hipertriptofanemia e na cistinose, sobre a atividade da piruvatoquinase em córtex cerebral de ratos Wistar em desenvolvimento. Os pacientes afetados por qualquer uma dessas patologias apresentam uma característica clínica comum: o dano cerebral. Além disso, os mecanismos fisiopatológicos causadores do dano cerebral nestas três doenças ainda são pouco compreendidos. Considerando que nos três distúrbios parece haver alteração na liberação/armazenamento e/ou utilização de energia pelo sistema nervoso central, a alteração na atividade da piruvatoquinase, uma enzima importante para o metabolismo energético deste tecido, poderia representar um mecanismo de neurotoxicidade comum a estas doenças.

A fenilcetonúria (PKU) é um EIM, causado pela deficiência severa na atividade da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH) hepática que converte fenilalanina (Phe) em tirosina (Tyr). Esta doença é bioquimicamente caracterizada pelo acúmulo de Phe e seus metabólitos no sangue e em outros tecidos. (Scriver e Kaufman , 2001). Estes pacientes afetados pela PKU desenvolvem um grau variável de disfunção neurológica, cujos mecanismos patogênicos ainda não estão claros, mesmo havendo o consenso de que a própria Phe deva ser o principal agente neurotóxico na doença.

A cistinose é uma desordem de estocagem autossômica recessiva hereditária rara, devida a um transporte deficiente de cistina através da membrana lisossomal (Gahl et al, 1982; Jonas et al, 1982). O acúmulo excessivo de cistina dentro dos lisossomos celulares progride à formação de cristais e por final conduz à morte celular e destruição do tecido (Gahl et al, 2001). Pacientes não tratados precocemente com cisteamina, desenvolvem insuficiência renal antes da puberdade, requerendo transplante renal (Gahl et al, 1992;

Markello et al, 1993). A cistinose, uma doença sistêmica, afeta muitos órgãos e tecidos, principalmente o cérebro em paciente adolescentes e adultos, e este dano nos tecidos depende do acúmulo de cistina. No entanto, os mecanismos pelos quais a cistina acumulada causa dano celular e tecidual, ainda são obscuros.

A hipertriptofanemia é uma desordem metabólica rara, provavelmente causada por um bloqueio na conversão do triptofano (Trp) a quinurenina, acumulando triptofano e alguns de seus metabólitos no plasma e nos tecidos dos pacientes. Os pacientes apresentam retardo mental leve a moderado com respostas afetivas exageradas, mudanças periódicas de humor, comportamento hipersexual, retardo no crescimento entre outros sintomas (Martin et al, 1995). Novamente, os mecanismos que levam ao dano cerebral são desconhecidos.

Os modelos animais são importantes instrumentos de pesquisa no estudo de mecanismos fisiopatológicos de doenças que ocorrem em humanos. Já foram desenvolvidos modelos animais experimentais de vários EIM em nosso laboratório, como fenilcetonúria (Wyse et al, 1995), hiperprolinemia tipo II (Moreira et al, 1989), acidemias metilmalônicas (Dutra et al, 1991) e propiônica (Brusque et al, 1999), e homocistinúria (Streck et al, 2002).

É sabido que a utilização da glicose pelo cérebro é importante e crítica para o funcionamento e desenvolvimento do órgão, pois a redução da liberação/armazenamento e utilização de energia pode causar falência do metabolismo, prejudicando a função celular e induzindo a um dano cerebral por meio de mecanismos distintos, incluindo excitotoxicidade. A PK catalisa um importante passo regulatório na rota glicolítica, a principal rota que proporciona energia para o funcionamento do cérebro. A PK catalisa a conversão do piruvato à fosfoenolpiruvato (PEP), um passo crítico da glicólise. Há pelo menos 4 formas de isoenzimas da PK em vertebrados, designadas L, M1, M2 (ou A) e R. Estas isoenzimas diferem em suas propriedades químicas, físicas, cinéticas, eletroforéticas

e imunológicas, assim como em sua distribuição nos tecidos (Hall et al, 1978). A PK M1 é a enzima cerebral e tem sido isolada e estudada em ratos (Srivastava et al, 1985), boi (Terlecki et al, 1989) e porco (Farrar et al, 1995). Todas as isoenzimas M1 estudadas apresentam uma estrutura tetramérica, falta de ativação pela frutose 1,6- bifosfato e, aparentemente, uma cinética hiperbólica em relação ao substrato PEP e o cofator Mg^{2+} . Considerando a PK uma enzima chave para o metabolismo da glicose no cérebro, e considerando que o metabolismo energético parece estar reduzido no cérebro de pacientes afetados pela PKU, cistinose e hipertriptofanemia, é possível que a diminuição da atividade dessa enzima possa contribuir para o dano cerebral característico destes pacientes. Portanto, resolvemos estudar os efeitos dos aminoácidos fenilalanina, cistina e triptofano (acumulados na fenilcetonúria, cistinose e hipertriptofanemia, respectivamente) e os metabólitos da fenilalanina (fenilpiruvato, fenilacetato, fenilactato, feniletilamina e *O*-hidroxi-fenilacetato) sobre a atividade da piruvatoquinase (PK) de córtex cerebral de ratos Wistar em desenvolvimento.

No presente trabalho, verificamos que a administração crônica de fenilalanina reduziu *in vivo* a atividade da pituvatoquinase (aproximadamente 25%) de córtex cerebral de ratos, e a administração simultânea da alanina preveniu esta redução. Verificamos também que a administração aguda de fenilalanina isolada ou associada à α -metil-fenilalanina também reduziu a atividade da PK em aproximadamente 18%, e a administração concomitante de alanina impediu a redução da atividade enzimática, enquanto que a administração isolada de α -metil-fenilalanina ou de alanina não alterou a atividade enzimática. No caso da administração aguda de triptofano, este também reduziu a atividade da piruvatoquinase no córtex cerebral dos ratos e esta redução persistiu por 12 horas, mesmo após o retorno dos

níveis cerebrais e plasmáticos do triptofano ao normal, e esta redução foi prevenida pela administração simultânea de alanina. Resultados preliminares em andamento no laboratório sugerem que a administração aguda ou crônica de cistina também reduzem a atividade da PK em córtex cerebral dos ratos.

A partir destes dados, investigamos os efeitos *in vitro* dos aminoácidos citados e dos metabólitos da fenilalanina sobre a atividade da PK. Observamos que a fenilalanina, o triptofano e a cistina inibiram a atividade enzimática de maneira dose-dependente e que a alanina preveniu estas inibições embora, no caso da cistina, apenas quando associada à GSH. Quanto aos metabólitos da fenilalanina, apenas o fenilpiruvato inibiu a atividade da PK, e esta inibição foi dose-dependente e prevenida pela alanina. Os estudos cinéticos realizados mostraram que a inibição causada pelos aminoácidos e pelo fenilpiruvato ocorreu por competição com os substratos enzimáticos PEP e ADP, e que a prevenção pela alanina ocorreu por competição com os inibidores.

Os estudos cinéticos mostraram ainda que a cistina parece inibir a atividade da PK por 2 mecanismos: um deles ocorre nos primeiros 30 minutos, provavelmente não relacionado à oxidação de grupos tiólicos da enzima, e o outro, operando ao longo do tempo, provavelmente relacionado à oxidação destes grupos tiólicos. A inibição causada pela cistina sobre a atividade da piruvatoquinase aos 30 minutos de pré-incubação foi competitiva em relação ao ADP e ao PEP, os dois substratos da enzima. Entretanto, quando pré-incubada por 120 minutos, a inibição foi do tipo misto (competitivo + não-competitivo) em relação ao ADP e PEP. Por outro lado, quando o experimento foi realizado aos 120 minutos de pré-incubação na presença de GSH, a inibição causada pela cistina foi do tipo competitivo em relação aos dois substratos, semelhante ao observado aos 30 minutos de pré-incubação. Ainda foi testada a cisteamina, a qual não afetou a atividade da

piruvatoquinase, mas preveniu e reverteu a inibição causada pela cistina sobre a atividade da enzima.

Os estudos de interação entre fenilalanina, triptofano, alanina e serina indicaram que os quatro aminoácidos devem agir no mesmo sítio enzimático, fenilalanina e triptofano inibindo a atividade enzimática, e alanina e serina prevenindo a inibição. Já os estudos de interação entre a cistina e a fenilalanina e entre a cistina e o triptofano indicaram que a cistina age sobre a enzima diferentemente dos outros dois aminoácidos, embora os estudos anteriores tenham sugerido que a cistina também se ligue no mesmo sítio de outros aminoácidos testados.

A isoforma M1 da PK tem sido considerada por alguns investigadores a única PK conhecida que mostra cinética hiperbólica e não tem controle alostérico (Kayne et al, 1973; Mattevi et al, 1996). Entretanto, há algumas evidências que caracterizam a isoforma M1 como uma enzima alostérica, tais como a forma tetramérica da enzima, permitindo ligação de 4 mol de Phe./ mol de enzima (Farrar et al, 1995), o efeito homotrópico do PEP, e a mudança da curva hiperbólica para sigmoideal na presença de Phe e Mn^{2+} , em vez de Mg^{2+} (Kayne et al, 1972).

Ibsen e Marles (1976) propuseram que a enzima é alostérica e apresenta 2 conformações: **T** (menos ativa) e **R** (mais ativa). Para explicar a inibição causada por Phe e prevenida por Ala, eles apresentaram uma hipótese de que os aminoácidos efetores se ligam no sítio ativo da enzima, no mesmo sítio de ligação do PEP. Entretanto, a Phe (com cadeia lateral apolar) também interagiria com uma região apolar da conformação **T**, desse modo estabilizando-a. A alanina (com cadeia lateral apolar muito pequena) pode também se ligar ao sítio ativo, mas não interage com a região não-polar da enzima, estabilizando a conformação **R**. A ligação do PEP no seu sítio ativo também estabiliza a conformação **R**.

Entretanto, esta hipótese não pode explicar a falta do efeito da Ala sobre a atividade da enzima quando ela se liga ao sítio do PEP no centro ativo da enzima, bloqueando a ligação deste substrato, nem a competição entre Phe ou PPA com ADP, conforme demonstramos no presente trabalho. Portanto, é provável que a ligação de Phe, PPA, ADP e PEP ocorram num sítio alostérico, fora do centro ativo da enzima.

Considerando o conjunto de dados obtidos no presente trabalho, juntamente com os dados da literatura, nossa hipótese é de que a piruvatoquinase M1 de córtex cerebral de ratos parece possuir um sítio de ligação para aminoácidos (fenilalanina, triptofano, cistina, alanina e serina), fenilpiruvato, e os substratos enzimáticos ADP e fosfoenolpiruvato) fora do centro ativo da enzima (Figura 6). A ligação de alanina, serina, ADP e fosfoenolpiruvato estabilizaria a enzima na forma R, mais ativa, enquanto a ligação com fenilalanina, triptofano, cistina e fenilpiruvato estabilizariam a enzima na forma T, menos ativa (Figura 7).

Considerando que o passo metabólico catalisado pela PK está entre a glicólise e a gliconeogênese, a atividade da enzima parece ser regulada através de um balanço entre aminoácidos, os principais substratos para a gliconeogênese. Entretanto, esta enzima torna-se alvo para aminoácidos acumulados em algumas doenças do catabolismo ou transporte de aminoácidos, sendo possível que a inibição ou diminuição da atividade da PK possa contribuir para o dano neurológico encontrado nestas desordens metabólicas. Por outro lado, é possível que o efeito *in vitro* da serina e da alanina prevenindo esta inibição enzimática pela Phe e Trp possa também ocorrer *in vivo*. Assim nesse caso, é aceitável que a suplementação com carboidratos, serina e/ou alanina para pacientes com fenilcetonúria ou hipertriptofanemia possa vir a ser útil no tratamento destes pacientes. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar o potencial benefício destas medidas suplementares.

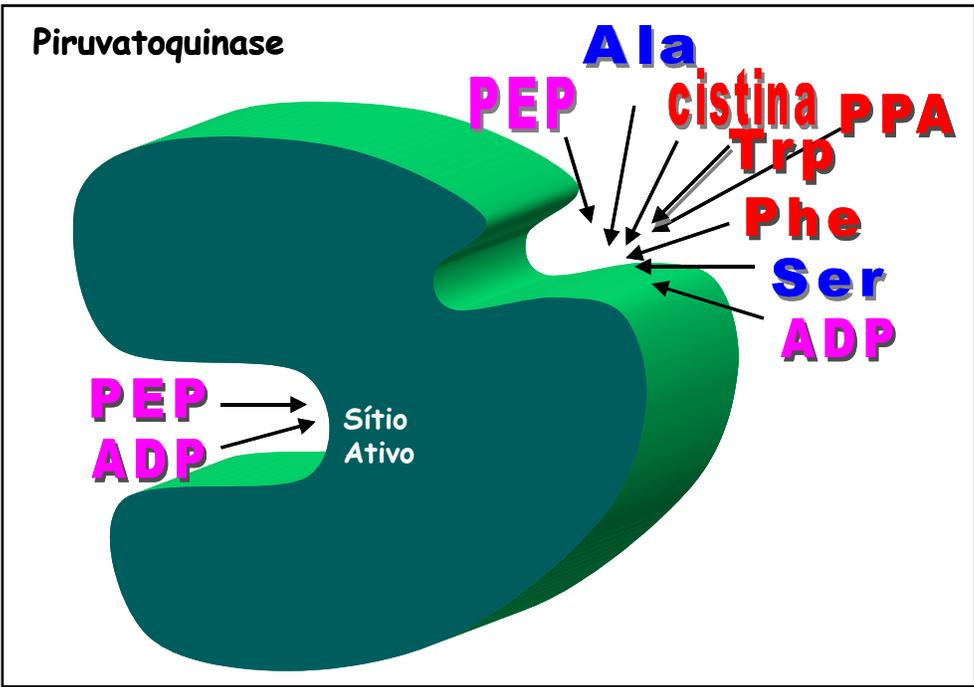


Figura 6

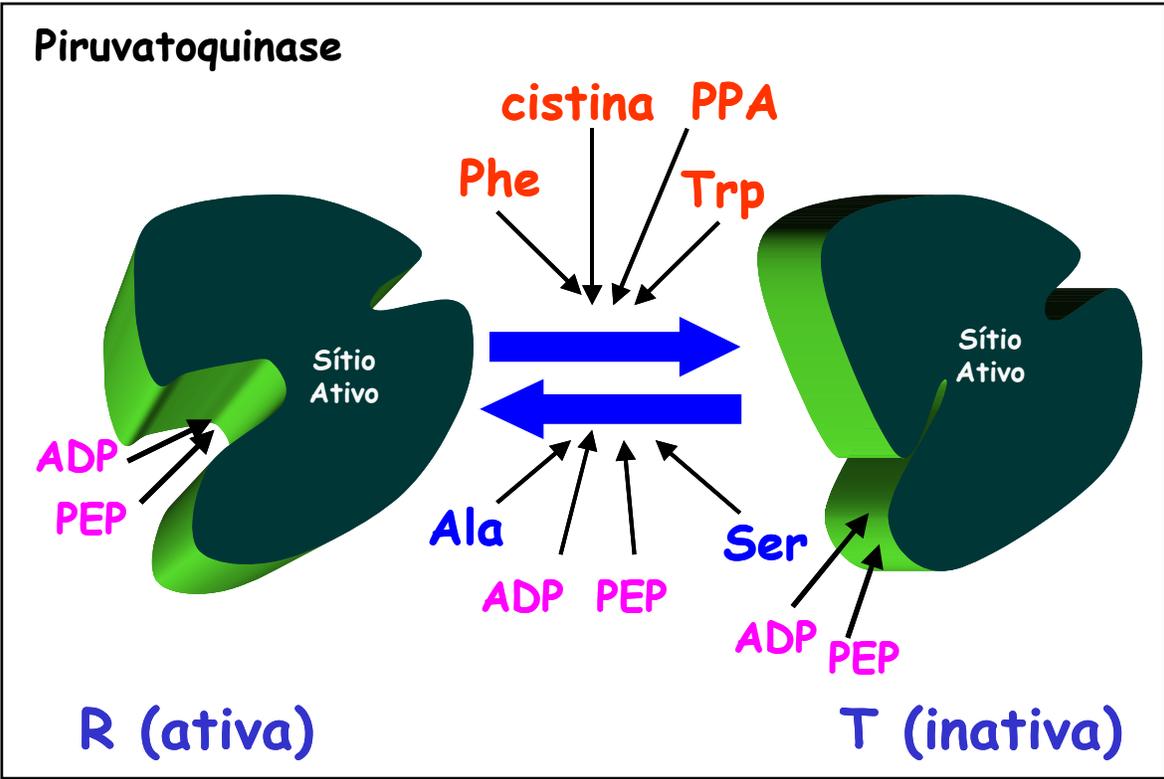


Figura 7

V. Conclusões

Objetivo 1 – *Investigar os efeitos in vitro e in vivo da fenilalanina e da alanina sobre a atividade da piruvatoquinase em córtex cerebral de ratos.*

Conclusões

1- A administração crônica de fenilalanina reduziu *in vivo* a atividade da piruvatoquinase (aproximadamente 25%) de córtex cerebral de ratos, e a administração simultânea da alanina preveniu esta redução.

2 - A administração aguda de fenilalanina isolada ou associada à α -metil-fenilalanina também reduziu a atividade da PK em aproximadamente 18%, e a administração concomitante de alanina impediu a redução da atividade enzimática. A administração isolada de α -metil-fenilalanina ou de alanina não alterou a atividade enzimática.

3- A fenilalanina inibiu a atividade da piruvatoquinase *in vitro* de maneira dose-dependente, e a alanina preveniu a inibição.

Objetivo 2 - Realizar estudos cinéticos da inibição da piruvatoquinase provocada pela fenilalanina e seu principal metabólito, o fenilpiruvato, em homogenizado livre de mitocôndrias de córtex cerebral de ratos Wistar de 22 dias de vida.

Conclusões

1- O fenilpiruvato inibiu a atividade da piruvatoquinase *in vitro* em homogenizado de córtex cerebral de ratos livre de mitocôndrias, de modo dose-dependente, e esta inibição foi prevenida pela adição da alanina ao meio de incubação. Os outros metabólitos da

fenilalanina, fenilactato, fenilacetato, feniletilamina e *O*-hidroxifenilacetato não alteraram a atividade da piruvatoquinase.

2 – Os estudos cinéticos sugeriram que a fenilalanina e o fenilpiruvato inibem a atividade da piruvatoquinase por competição com ADP e fosfoenolpiruvato, os dois substratos da enzima, e que a alanina previne a inibição por competição com a fenilalanina e com o fenilpiruvato.

3- Os estudos cinéticos sugeriram que a piruvatoquinase tem um sítio de ligação para fenilalanina, fenilpiruvato e alanina, e que este sítio provavelmente está localizado fora do centro ativo da enzima.

Objetivo 3 - Investigar o efeito in vitro da cistina sobre a atividade da piruvatoquinase em homogenizado livre de mitocôndrias de córtex cerebral de ratos Wistar de 22 dias de vida e caracterizar cineticamente o tipo de inibição.

Conclusões

1- A cistina inibiu a atividade da PK *in vitro* em homogenizado de córtex cerebral de ratos livre de mitocôndrias, com o efeito dose-dependente e este efeito pode ser prevenido pela adição da alanina + GSH no meio de incubação. A adição de alanina no meio de incubação não preveniu nem reverteu a inibição causada pela cistina *in vitro*.

2- A cistina parece inibir a atividade da PK por 2 mecanismos: um deles ocorre nos primeiros 30 minutos, provavelmente não relacionado à oxidação de grupos tiólicos da enzima, e o outro, operando ao longo do tempo, provavelmente relacionado à oxidação dos grupos sulfidrilas da enzima.

3- A inibição causada pela cistina sobre a atividade da piruvatoquinase aos 30 minutos de pré-incubação foi competitiva em relação ao ADP e ao fosfoenolpiruvato, os dois substratos da enzima. Entretanto, quando pré-incubada por 120 minutos, a inibição foi do tipo misto (competitivo + não-competitivo) em relação ao ADP e PEP. Por outro lado, quando o experimento foi realizado aos 120 minutos de pré-incubação na presença de GSH, a inibição causada pela cistina foi do tipo competitivo em relação aos dois substratos, semelhante ao observado aos 30 minutos de pré-incubação.

4 - A cisteamina não afetou a atividade da piruvatoquinase, mas preveniu e reverteu a inibição causada pela cistina sobre a atividade da enzima.

Objetivo 4 -Determinar o efeito in vivo e in vitro do triptofano sobre a atividade da PK em córtex cerebral de ratos, e o efeito da alanina sobre a inibição in vitro e in vivo.

Conclusões

1 – A administração de triptofano reduziu a atividade da piruvatoquinase no córtex cerebral dos ratos e esta redução persistiu por 12 horas, mesmo após o retorno dos níveis cerebrais e plasmáticos do triptofano ao normal, e esta redução foi prevenida pela administração simultânea de alanina.

2 - O triptofano inibiu in vitro a piruvatoquinase de maneira dose-dependente, e esta inibição foi prevenida pela incubação concomitante com alanina.

Objetivo 5 - Realizar estudos cinéticos da interação entre os aminoácidos fenilalanina, triptofano, cistina, alanina e serina sobre a atividade da piruvatoquinase em homogenizado livre de mitocôndrias de córtex cerebral de ratos Wistar de 22 dias de vida.

Conclusões

1- O triptofano inibiu a atividade da piruvatoquinase por competição com os substratos ADP e fosfoenolpiruvato, e a alanina preveniu esta inibição por competição com o triptofano.

2 – Os estudos de interação entre fenilalanina, triptofano, alanina e serina indicaram que os quatro aminoácidos devem agir no mesmo sítio enzimático, fenilalanina e triptofano inibindo a atividade enzimática, e alanina e serina prevenindo a inibição.

3 – Os estudos de interação entre a cistina e a fenilalanina e entre a cistina e o triptofano indicaram que a cistina age sobre a enzima diferentemente dos outros dois aminoácidos. Entretanto, estudos prévios sugerem que a cistina também se ligue no mesmo sítio de outros aminoácidos testados.

Conclusões gerais

1- A piruvatoquinase de córtex cerebral de ratos parece possuir um sítio de ligação para aminoácidos (fenilalanina, triptofano, cistina, alanina e serina), fenilpiruvato, e os substratos enzimáticos ADP e fosfoenolpiruvato). A ligação de alanina, serina, ADP e fosfoenolpiruvato estabilizaria a enzima na forma R, mais ativa, enquanto a ligação com fenilalanina, triptofano, cistina e fenilpiruvato estabilizariam a enzima na forma T, menos ativa.

2- Considerando o papel importante da piruvatoquinase no metabolismo energético cerebral, a sua inibição poderia constituir-se em um mecanismo de neurotoxicidade comum aos três distúrbios estudados: fenilcetonúria, hipertriptofanemia e cistinose.

VI. Perspectivas

Esse trabalho abre oportunidades de novos estudos, tais como:

1 – Determinar a atividade da piruvatoquinase em leucócitos de pacientes afetados por fenilcetonúria, hipertriptofanemia e cistinose, e verificar se o tratamento convencional destes pacientes altera ou não a atividade da enzima.

2- Estudar o potencial benefício da suplementação de carboidratos, serina e/ou alanina na dieta de pacientes com PKU ou hipertriptofanemia.

3 - Desenvolver um modelo animal crônico de hipertriptofanemia, determinar a atividade da piruvatoquinase no cérebro destes animais e analisar os efeitos da suplementação de carboidratos e da co-administração de alanina e/ou serina nestes animais.

4 - Desenvolver um modelo animal experimental agudo e crônico de cistinose, determinar a atividade da piruvatoquinase nos diversos tecidos destes animais e analisar os efeitos da co-administração de cisteamina nestes animais.

5 - Estudar os efeitos da cistina sobre a atividade de outras enzimas tiólicas envolvidas no metabolismo energético de diversos tecidos e órgãos afetados pela cistinose.

6 - Investigar o efeito da cistina sobre o estresse oxidativo e o metabolismo energético em diversos tecidos e órgãos afetados pela cistinose.

7 – Investigar o efeito da cistina sobre a atividade de enzimas lisossomais em diversos tecidos e órgãos afetados pela cistinose.

VII. Referências Bibliográficas Adicionais

Adelbert Ames III (2000) CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res. Rev.* **34**: 42 – 68.

Almond P.S., Matas A.J., Nakhleh R.E., Morel P., Troppmann C., Najarian J.S., Chavers B. (1993) Renal transplantation for infantile cystinosis: Long-term follow-up. *J. Pediatr. Surg.* **28**: 232.

Anikster Y., Lacbawan F., Brantly M., Gochuico B.L., Avila N.A., Travis W., Gahl W.A. (2001) Pulmonary dysfunction in adults with nephropathic cystinosis. *Chest* **119**: 394 – 401.

Anikster Y., Lucero C., Touchman J.W., Huizing M., McDowell G., Shotelersuk V., Green E.D., Gahl W.A. (1999) Identification and delection of the common 65-kb deletion breakpoint in the nephropathic cystinosis gene (*CTNS*). *Mol Genet Metab* **66**: 111 – 116.

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

Antonarakis S.E., the Nomenclature Working Group (1998). Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. *Hum Mutat* **11**: 1 –3.

Avison M. J., Herschkowitz N., Novotny E. J., Petroff O.A.C., Rothman D.L., Colombo J.P., Bachmann C., Shulamn R.G., Princhar J.W. (1990) Proton NMR observation of

phenylalanine and an aromatic metabolite in the rabbit brain in vivo, *Pediatr.Res.* **27**: 566-570.

Bachelard H.S. (1978) Glucose as fuel for the brain. *Biochem. Soc. Trans.* **6**: 520-524.

Balász R. (1965) Control of glutamate metabolism: the effect of pyruvate. *J. Neurochem.* **12**: 63 – 67.

Bannai S. and Ishii T. (1988) A novel function of glutamine in cell culture: utilization of glutamine for the uptake of cystine in human fibroblasts. *J cell Physiol.***137**:360 – 366.

Bannai S. and Taiteishi N. (1986) Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals. *J Membr Biol* **89**: 1 – 8.

Bannai S. and Kitamura E. (1980) Transport interaction of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture. *J Biol Chem* **255**: 2372 – 2376.

Banos G., Daniel P.M., Pratt O.E. (1978) The effect of age upon the entry of some amino acids into the brain and its incorporation into cerebral protein. *Develop. Med. Child Neurol.* **20**: 335 – 346.

Bauman M.L. and Kemper T.L. (1982) Morphologic and histoanatomic observations of the brain in untreated human phenylketonuria. *Acta Neuropathol.* **58**: 55 – 60.

Beudet A.L., Scriver C.H., Sly W.S., Valle D., Cooper D.N., Mckusik V.A., Schmidke J. (1989) Genetics and Biochemistry of variant human phenotypes. In: *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, Scriver C.R., Beudet A.L., Sly W.S. and Valle D., 1989, 6^o ed, New York, McGraw-Hill, p 3 – 53.

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

Berman P.W., Graham F.K., Eichman P.L., Waisman H.A.(1961) Psychologic and neurologic status of diet-treated phenylketpnruc children and their siblings. *Pediatrics* **28**: 924 – 934.

Bernar J., Tietze F.,Kohn L.D., Bernardini I., Harper G.S., Grollman E.F., Gahl W.A. (1986) Characteristics of a lysosomal transport membrane system for tyrosine and other neutral amino acids in rat thyroid cells. *J Biol Chem* **261**: 17107 – 17112.

Bick U., Ullrich K., Stöber U., Möller H., Schuierer G., Ludolph A. C., Oberwittler C., Weglage J., Wendelm U. (1993) Withe matter abnormalities in patients with treated hyperphenylalaninemia: Magnetic resonance relaxometry and proton spectroscopy findings. *Eur.J. Pediatr.* **152**: 1012 – 1020.

Bittar E.G., Charnay Y., Pellerin L., Bouras c., Magistretti P.J. (1996) Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **16**: 1079 – 1089.

Bowden J.A. and McArthur 3rd , C.L. (1972) Possible biochemical model for phenylketonuria. *Nature.* **235**: 5335.

Brodehl J., Ehrich J.H.H., Krohn J.P., Offner G., Byrd D (1984) Kidney transplantation in nephropathic cystinosis, in Brodehl J. Ehrich J.H.H. (eds): *Pediatric Nephrol.* Berlin, Springer-Verlag, p 172.

Bröer S., Rahman B., Pellegrini G, Pellerin J., Martin L., Verleysdonk S., Hamprecht B., Magistretti P.J. (1997) Comparison of lactate transport in astroglial cells and monocarboxylate transporter 1 (MCT 1) expressing *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* **272**: 30096 – 30102.

Broyer M., Guillot M., Gubler M.C., Habib R. (1981) Infantile cystinosis: A reappraisal of early and late symptoms. *Adv. Nephrol.* **10**: 137.

Brusque AM., Mello C.F., Buchanan D.N., Terracciano S.T., Rocha M.P., Vargas C.R., Wannmacher C.M.D., Wajner M. (1999) Effect of chemically induced propionic acidemia on neurobehavioral development of rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **64**: 529 – 534.

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

Carreras A.L.R., Mattos-Dutra A., Meirelles R., Rocha B.B., Wannmacher C.M.D., and Pessoa-Pureur R. (2000) Phenylalanine inhibition of the phosphorylation of cytoskeletal proteins from cerebral cortex of young rats is prevented by alanine. *Eur. J.Clin. Invest.***30**: 536 – 542.

Chan AM., Lynch M.J., Bailey J.D., Ezrin C., fraser D. (1970) Hypothyroidism in cystinosis. A clinical, endocrinologic and histologic study involving sixteen patients with cystinosis. *Am. J. Med.* **48**: 678.

Chang S.H., Wilken D.R. (1966) Participation of the unsymmetrical disulfide of coenzyme A and glutathione in an enzymatic sulfhydryl-disulfide interchange: particle purification and properties of the bovine kidney enzyme. *J Biol Chem* **241**: 4251 – 4260.

Charnas L.R., Luciano C.A., Dalakas M., Gilliat R.W., Bernardini I., Ishak K., Swik V.A., Fraker D., Brushart T.A., Gahl W.A. (1994) Distal vacuolar myopathy in nephropathic cystinosis. *Ann Neurol* **35**: 181 – 188.

Cherqui S., Sevin C, Hamard G., kalatzis V., Sich M., Pequignot M.O., Gogat K., Abitbol M., Broyer M., Gubler M.C., and Antignac C. (2002) Intralysosomal cystine accumulation

in mice lacking cystinosin, the protein defective in cystinosis. *Mol. Cell. Biol* **22**: 7622 – 7632.

Chilk C.L., Friedman A., Merriam G.R., Gahl W.A. (1993) Pituitary-testicular function in nephropathic cystinosis. *Ann Intern Med* **119**: 568 – 575.

Cleary M. A., Walter J. H., Wraith J. E., Jenkins J. P., Alani S. M., Tyler K., Whittle D. (1994) Magnetic resonance imaging of the brain in phenylketonuria. *Lancet* **344**: 87 – 90.

Cochat P., Drachman R., Gagnadoux M.F., Pariente D., Broyer M. (1986) Cerebral atrophy and nephropathic cystinosis. *Arch. Dis. Child.* **61**: 401.

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

Cogan D.G., Kuwabara T. (1960) Ocular pathology of cystinosis with particular reference to the elusiveness of the corneal crystals. *Arch. Ophthalmol.* **63**: 51

Consler T.G. and Lee J.C. (1988) Domain interaction in rabbit muscle pyruvate kinase. II. Small angle neutron scattering and computer simulation. *J. Biol. Chem.* **263**: 2787-2793.

Consler T.G., Jennewein M.J., Cai G.Z. and Lee J.C (1992) Energetics of allosteric regulation in muscle pyruvate kinase. *Biochemistry.* **31**: 7870-7878.

Consler T.G., Woodward S.H. and Lee J.C (1989) Effects of primary sequence differences on the global structure and function of an enzyme: a study of pyruvate kinase isozymes. *Biochemistry*.**28**: 8756-8764.

Cystinosis Collaborative Research Group (1995) Linkage of the gene for cystinosis to markers on the short arm of chromosome 17. *Nature Genet* **10**: 246 – 248.

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

Danks D.M. (1981) Inborn Errors of Metabolism – A review of Some General Concepts. *Aust. N.Z. Med.*, **11**: 309 - 320.

De Bruin L.A., Schasfoort E.M.C., Steffens A.B., Korf J. (1990) Effects of stress and exercise on rat hippocampus and striatum extracellular lactate. *Am. J. Physiol.* **259**: 773 – 779.

De Freitas M.S., de Mattos A.G., Camargo M.M., Wannmacher C.M.D., and Pessoa-Pureur R. (1995) Effect of phenylalanine and α -methylphenylalanine on in vitro incorporation of ^{32}P into cytoskeletal cerebral proteins. *Neurochem. Int.***26**: 381 – 385.

Drochmans P. (1962) Morphologie du glycogène. Etude au microscope électronique en coloration négative du glycogène particulaire. *J. Ultrastruct. Res.* **6**: 141-163.

Drummond K.N., Micheal A.F., Ulstrom R.D., Good R.A. (1964) The blue diaper syndrome: familial hypercalcemia with nephrocalcinosis and indicanuria. *Am J Med* **37**: 928 – 948.

Dutra J.C., Wajner M., Wannmacher C.M.D., Wannmacher L.E., Pires R.F., Rosa-Junior A. (1991) Effect of postnatal methylmalonate administration on adult rat behavior. *Braz. J. Méd. Biol. Res.* **24**: 595 – 605.

Ehrenreich B.A., Cohn Z.A. (1969) The fate of peptides pinocytosed by macrophages *in vitro*. *J. Exp. Med.* **129**: 227.

Ehrich J.H.H., Brodehl J., Byrd D.I., Hossfeld S., Hoyer P.F., Leipert K-P, Offner G., Wolff G. (1991) Renal transplantation in 22 children with nephropathic cystinosis. *Pediatr. Nephrol.* **5**: 707.

Ehrich J.H.H., Stoepler L., Offner G., Brodehl J. (1970) Evidence for cerebral involvement in nephropathic cystinosis. *Nueropaediatric* **10**: 128 – 137.

Elferink R.P., Harms E., Strijland A., Tager J.M. (1983) The intralysosomal pH in cultured human skin fibroblasts in relation to cystine accumulation in patients with cystinosis. *Biochem Biophys Res Commun* **116**: 154 – 161.

Eriksson S.A., Mannervik B. (1970) The reduction of the L-cystine-glutathione mixed disulfide in rat liver: involvement of an enzyme catalyzing thiol-disulfide interchange. *FEBS Lett* **7**: 26- 28.

Farrar G., Farrar W. W. (1995) Purification and properties of the pyruvate kinase isozyme M₁ from the pig brain, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **27**: 1145 – 1151.

Feigelson P., Feigelson M., Greengard O. (1962) Comparison of the mechanisms of hormonal and substrate induction of rat liver tryptophan pyrrolase. *Recent Progr Horm Res* **18**: 491.

Fenton D.A., Wilkinson J.D., Toseland P.A. (1983) Family exhibiting cerebellar-like ataxia, photosensitivity, and shortness of stature – A new inborn error of tryptophan metabolism. *J R Soc Med* **76**: 736.

Fink J.K., Brouwers P., Barton N., Malekzadeh M.H., Sato S., Hill S., Cohen W.E., Fivush B., Gahl W.A. (1989) Neurologic complications in longstanding nephropathic cystinosis. *Arch Neurol* **46**: 543 – 548.

Fish O.R., Torres F., Graven H.J., Greenwood C.S., Anderson J.A. (1969) Twelve years of clinical experience with phenylketonuria. *Neurology (Minneap)* **19**: 81 – 86.

Fivush B., Green O.C., Porter C.C., Balfe J.W., O'Regan S., Gahl W.A. (1987) Pancreatic endocrine insufficiency in post-transplant cystinosis. *Am J Dis Child* **141**: 1087 – 1089.

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

Forestier L., Jean G., Attard M., Cherqui S., Lewis C., van't Hoff W., Broyer M., Town M., Antignac C. (1999) Molecular characterization of *CTNS* deletions in nephropathic cystinosis: Development of a PCR-based detection assay. *Am J Hum Genet* **65**: 353 – 359.

Friesen R.H.E (1998) Effects of conserved residues on the allosteric regulation of pyruvate kinase: a structure-function study of rabbit muscle and kidney-pyruvate kinase. PhD thesis.

Gahl W.A., Thoene J.G., Schneider J.A. (2001) Cystinosis: A disorder of lysosomal membrane transport. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. (Scriver C.R., Beaudet A.L., Valle D., Sly W.S., Eds). New York: McGraw-Hill, pp 5085-5108.

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

Gahl W.A., Dalakas M.C., Charnas L., Chen K.T., Pezeshkpour G.H., Kuwabara T., Davis S.L., Chesney R.W., Fink J., Hutchison H.T. (1988) Myopathy and cystine storage in muscles in a patient with nephropathic cystinosis. *N. Engl. J. Med.* **319**: 1461.

Gahl W.A., Reed G.F., Thoene J.G., Schulman J.D., Rizzo W.B., Jonas A.J., Denman D.W., Schlesselman J.J., Corden B.J., Schneider J.A. (1987) Cysteamine therapy for children with nephropathic cystinosis. *N Engl J Med* **316**: 971 – 977.

Gahl W.A. (1986) Cystinosis coming of age. *Adv Pediatr* **33**: 95 – 126.

Gahl W.A., Tietze F., Butler J.D., Schulman J.D. (1985) Cysteamine depletes cystinotic leucocyte granular fractions of cystine by the mechanism of disulphide interchange. *Biochem. J.* **228**: 545.

Gahl W.A., Tietze F., Bashan N., Bernardini I., Raiford D., Schulman J.D. (1983) Characteristics of cystine counter-transport in normal and cystinotic lysosome-rich leukocyte granular fractions. *Biochem J* **216**: 393 – 400.

Gahl W.A., Bashan N., Bernardini I., Schulman J.D. (1982) Cystine transport is defective in isolated leukocyte lysosomes from patients with cystinosis. *Science* **217**: 1263 – 1265.

* Gahl W.A., Tietze F., Bashan N., Steinhertz R., Schulman J.D. (1982) Defective cystine exodus from isolated lysosome-rich fractions of cystinotic leukocytes. *J. Biol. Chem.* **257**: 9570 – 9575.

Gaitonde M.K., Dahl D.R., Elliott K.A.C (1965) Entry of glucose carbon into amino acids of rat brain liver *in vivo* after injection of uniformly ¹⁴C-labelled glucose. *J Biochem.* **94**: 345-352.

Garrod A. E. (1908) Inborn errors of metabolism. *Lancet* 2:1.

Gerhart D.Z., Enerson B.E., Zhdankina O.Y., Leino R.L., Drewes L.R. (1997) Expression of monocarboxylate transporter MCT 1 by brain endothelium and glia in adult and suckling rats. *Am. J. Physiol.* **273**: 207 – 213.

Giugliani R. (1988) Erros inatos do metabolismo: uma visão panorâmica. *Pediatria Moderna.* **23**: 29 – 40.

Goldsmith G.A. (1964) The B vitamins: Thiamine, riboflavin, niacin, in Beaton G.H., McHenry E.W. (eds): *Nutrition. A comprehensive Treatise*. New York, Academic. **2**: 110.

Hakim A.M., Moss G., Gollomp S.M (1976) The effect of hypoxia on the pentose pathway in brain. *J. Neurochem.* **26**: 683-688.

Hall E. R., Cottam G. L.(1978) Isoenzymes of pyruvate kinase in vertebrates: their physical, chemical, kinetic and immunological properties, *Int. J. Biochem.* **9**: 785 – 793.

Hanley W.B., Lee A.W., Hanley A.J., Lehotay D.C., Austin V.J., Schoonheydt W.E. and Clark B.A.P.J.T. (2000) "Hypotirosinemia" in phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* **69**: 286 – 294.

Harkins R.N., Black J.A. and Rittenberg M.B (1977) Purification and characterization of human muscle pyruvate kinase. *Can. J. Biochem.* **55**: 301-307.

Harnes M.D., Carter R.F., Pollard A. C., Carey W.F. (1980) Light and electron microscopy of infantile and fetal tissues in cystinosis. *Micron.* **11**: 443.

Hasselbach S., Knudsen G.M., Toft P.B., Høgh P., Tedeschi E., Holm S., Videback C., Henriksen O., Lou H.C. and Paulson O.B. (1996) Cerebral glucose metabolism is decreased in white matter changes in patients with phenylketonuria. *Pediatric. Res.* **40**: 21 – 24.

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

Hevor T.K. (1994) Some aspects of carbohydrate metabolism in the brain. *Biochimie* **76**: 111-120.

Heyduk E., Heyduk T. and Lee J.C. (1992) Global conformation changes in allosteric proteins. A study of *Escherichia coli* cAMP receptor protein and muscle pyruvate kinase. *J. Biol. Chem.***267**: 3200-3204.

Holtzaple P.G., Genel M., Yakovac W.C., Hummeler K., Segal S. (1969) Diagnosis of cystinosis by rectal biopsy. *N. Engl. J. Med.* **281**: 143.

Holtzman N.A., Kronmal R.A., van Doorninck W., Azen C., Koch R. (1986) Effect of age at loss of dietary control on intellectual performance and behavior of children with phenylketonuria. *New Engl. J. Med.* **314** 593 – 598.

Hostetler K.Y., Landau B.R., White R.J., Albin M.S., Yashon D. (1970) Contribution of the pentose cycle to the metabolism of glucose in the isolated, perfused brain of the monkey. *J. Neurochem.***17**: 33-39.

Ibsen K.H., Marles S. W.(1976) Inhibition of chicken pyruvate kinases by amino acids, *Biochemistry.* **15**: 1073 – 1079.

Jonas A.J., Conley S.B., Marshall R., Johnson R.A., Marks M., Rosenberg H. (1987) Nephropathic cystinosis with central nervous system involvement. *Am. J. Med.* **83**: 966.

Jonas A.J., Smith M.L., Schneider J.A. (1982) ATP-dependent lysosomal cystine efflux is defective in cystinosis. *J Biol Chem* **257**: 13185 – 13188.

* Jonas A.J., Greene A.A., Smith M.L., Schneider J.A. (1982) Cystine accumulation and loss in normal, heterozygous, and cystinotic fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 4442 – 4445.

Kaiser-Kupfer M.I., Gazzo M.A., Datiles M.B., Caruso R.C., Kuchl E.M., Gahl W.A. (1990) A randomized placebo-controlled trial of cysteamine eyedrops in nephropathic cystinosis. *Arch Ophthalmol* **108**: 689 – 693.

Kaiser-Kupfer M.I., Fujikawa L., Kuwabara T., Gahl W.A. (1987) Removal of corneal crystals by topical cysteamine in nephropathic cystinosis. *N Engl J Med* **316**: 775 – 779.

Kaiser- Kupfer M.I., Caruso R.C., Minkler D.S., Gahl W.A. (1986) Long-term ocular manifestations in nephropathic cystinosis. *Arch. Ophthalmol.* **104**: 706.

Kayne F.J., Price N. C. (1973) Amino acid effector binding to rabbit muscle pyruvate kinase, *Arch. Biochem. and Biophysics.* **159**: 292 – 296.

Kayne F.J., Price N. C. (1972) Conformational changes in the allosteric inhibition of muscle pyruvate kinase by phenylalanine, *Biochemistry* **11**: 4415 – 4420.

Keele A.C., Neil E., Joels N.(1982) *Sansom Wright's applied phymology.* Oxford University Press. Oxford. 13th edition, 133-154.

Kleta R., Anikster Y., Lucero C., Shotelersuk V., Huizing M., Bernanrdini I., Park M., Thoene J., Schneider J. and Gahl W.A. (2001) *CTNS* mutations in African American patients with Cystinosis. *Molecular Genetics and Metabolism*, **74**: 332- 337.

Knapp A. (1960) Familial essential tryptophan metabolism disorder (essential hereditary vitamin B6 deficiency). *Klin Wochenschr* **38**: 74 – 80.

Koisumi F., Koeda H.T., Wakaki K., Matumoto M., Kobashi K., Akao T. and Fukase M. (1985) Cystinosis with marked atrophy of the kidneys and thyroid. Histological and ultrastructural studies in an autopsy case. *Acta Pathol. Jpn.* **35**: 145 – 155.

Kooistra T., Millard P.C., Lloyd J.B. (1982) Role of thiols in degradation of proteins by cathepsins *biochem J* **204**: 471 – 477.

Korn D. (1960) Demonstration of cystine crystals in peripheral white blood cells in a patient with cystinosis. *N. Engl. J. Med.* **262**: 545.

Krasnewich D., Gahl W.A. (1991) Cystinosis: A treatable lysossoaml storage disease. *Endocrinologist* **1**: 111 – 118.

Krause W., Halminski M., McDonald L., Dembure P., Salvo R. (1985) Biochemical and neuropsychological effects of elevated plasma phenylalanine in patients with treated phenylketonuria. A model for the study of phenylalanine and brain function in man. *J. Clin. Invest.* **75**: 40 – 48.

Kromrower G.M., Wilson V., Clamp J.R., Westall R.G. (1964) Hydroxykynureninuria: a case of abnormal tryptophan metabolism probably due to a deficiency of kynureninase. *Arch Dis Child* **39**: 250.

Lehninger A.L., Nelson D.L. and Cox M.M. (1993) *Princípios de Bioquímica*. Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda, São Paulo, 2ª edição.

Levy H.L. (2001) Harnup disorder. In (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly W.S. e Valle D., eds) *The metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, 8th edn, McGraw-Hill, New York, pp 1667 – 1724.

Levy H.L. (1979) Harnup disorder. In (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly W.S. e Valle D., eds) *The metabolic Bases of Inherited Diseases*, 6th edn., McGraw-Hill, New York, pp 2515 – 2527.

Lloyd J.B. (1986) Disulphide reduction in lysosomes. *Biochem J* **237**: 271 – 272.

Lo D. (1996) Animal models of disease and Basic Science, *Horm. Metab., Res.* **28**: 296 – 298.

Lou H. C., Güttler F., Lykkelund C., Niederwieser A. (1985) Decreased vigilance and neurotransmitter syntheses after discontinuation of dietary treatment of phenylketonuria in adolescents. *Eur. J. Pediatr.* **144**: 17 – 29.

Lubs H.A. (1977) Frequency of genetic disease. In: Lubs H.A. and De La Cruz F.: eds. Genetic counseling. New York Raven Press.

Lütz M.G., Feksa L.R., Wyse A.T.S., Dutra-Filho C.S., Wajner M., Wannmacher C.M.D. (2003) Alanine prevents in vitro inhibition of glycolysis caused by phenylalanine in brain cortex of rats. *Metabolic Brain Dis.* **18**: 87 – 94.

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

Martin J.R., Mellor C.S. (1995) Familial hypertryptophanemia in two siblings. *Clin. Genet* **47**: 180 – 183.

Marzzoco A. and Torres B.B. (1990) *Bioquímica Básica*. Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro.

Mattevi A., Bolognesi M. and Valentini G (1996) The allosteric regulation of pyruvate kinase. *FEBS Letters*.**389**: 15-19.

McGowan-Jordan J., Stoddard K., Podolsky L., Orrbine E., McLaine P., Town M., Goodyer P., MacKenzie A., Heick H. (1999) Molecular analysis of cystinosis: Probably Irish origin of the most common French Canadian mutation. *Eur J Hum Genet* **7**: 671 – 678.

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

Mego J.L. (1984) Role of thiols , pH and cathepsin D in the lysosomal catabolism of serum albumin. *Biochem J* **218**: 775 – 783.

Monod J., Wyman J. and Changeux J.P (1965) On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* **12**: 88-118.

Morecki R., Paunier L., Hamilton J. R. (1968) Intestinal mucosa in cystinosis. A fine structure study. *Arch. Pathol.* **86**: 297.

Moreira J.C.F., Wannmacher C.M.D., Costa S.M., Wajner M. (1989) Effect proline administration on rat behavior in aversive and nonaversive tasks. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **32**: 885 – 890.

Nehlig A. (1978) Divers aspects du métabolisme énergétique et du métabolisme des acides aminés dans le télencéphale du Poulet au cours de la maturation postnatale. *Thèse de Doctorat d'Etat*, Université de Nancy 1, p 256.

Nelson D.L. and Cox M.M. (2000) *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth, New York, 3rd ed. Edition.

Oberfelder R.W., Barisas B.G. and Lee J.C. (1984) Thermodynamic linkages in rabbit muscle pyruvate kinase: kinetic, equilibrium, and structural studies. *Biochemistry*. **23**: 3813-3821.

Pan H., Lee J.C. and Hilser V.J. (2000) Binding sites in *Escherichia coli* dihydrofolate reductase communicate by modulating the conformational ensemble. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 12020-12025.

Patrick A. D. (1965) Deficiencies of SH-dependent enzymes in cystinosis. *Clin. Sci.* **28**: 427 – 443.

Pellegrin L., Pellegrini G., Martin L., Magistretti P.J. (1998) Expression of monocarboxylate transporter mRNAs in mouse brain: support for a distinct role of lactate as an energy substrate for the neonatal versus adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 3990 – 3995.

Penrose L., Quastel J.H. (1937) Metabolic studies in phenylketonuria. *Biochem. J*, **31**: 266.

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

Pisoni R.L., Acker T.L., Lisowski K.M., Lemons R.M., Thoene J.G. (1990) A cystine-specific lysosomal transport system provides a major route for the delivery of thiol to

human fibroblast lysosomes: Possible role in supporting lysosomal proteolysis. *J. Cell Biol.* **110**: 327.

Pisoni R.L., Thoene J.G. (1989) Detection and characterization of a nucleoside transport system in human fibroblast lysosomes. *J Biol Chem* **264**: 4850 – 4856.

Pisoni R.L., Flickinger K.S., Thoene J.G., Christensen H.N. (1987) Characterization of carrier-mediated transport systems for small neutral amino acids in human fibroblast lysosomes. *J Biol Chem* **262**: 6010 – 6017.

Pisoni R.L., Thoene J.G., Lemons R.M., Christensen H.N. (1987) Important differences in cationic amino acid transport by lysosomal system c and system y^+ of the human fibroblast. *J Biol Chem* **262**: 15011 – 15018.

Pisoni R.L., Thoene J.G., Christensen H.N. (1985) Detection and characterization of carrier-mediated cationic amino acid transport in lysosomes of normal and cystinotic human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **260**: 4791.

Poole R.C., Halestrap A.P. (1993) Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am. J. Physiol.* **264**: C 761 - 782

Price J.M., Yess N., Brown R.R., Johnson S.A.M. (1967) Tryptophan metabolism: a hitherto unreported abnormality occurring in a family. *Arch Dermatol* **95**: 462 – 471.

Prichard J., Rothman D., Novotny E., Petrof O., Kuwabara T., Avison M., Howsen A., Hanstock C., Schulman R. (1991) Lactate rise detected by ^1H NMR in human visual cortex during physiologic stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5829 – 5831.

Reiss R.E., Kuwabara T., Smith M.L., Gahl W.A. (1988) Successful pregnancy despite placental cystine crystals in a woman with nephropathic cystinosis. *N. Engl. J. Med.* **319**: 223.

Salih M.A.M., Bender D.A., McCreanor G.M. (1985) Lethal familial pellagra-like skin lesion associated with neurologic and developmental impairment and the development of cataracts. *Pediatrics* **76**: 787.

Sappey-Marini D., Calabrese G., Fein G., Hugg J.W., Biggins C., Weiner M.W. (1992) Effect of pholic stimulation on human visual cortex lactate and phosphates using ^1H and ^{31}P magnetic resonance spectroscopy. *J Cereb. Blood Flow Metab.* **12**: 584 – 592.

Schneider J.A. and J.D. Schulman J. D. (1983) Cystinosis. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Stanbury J.B., Wyngaarden J.B, Fredrickson D.S., Goldstein J. L., Brown M.S. eds):, 5th ed., pp 1844 – 1866, McGraw-Hill, New York.

Schimke R.T., Sweeney E.W., Berlin C.M. (1965) The roles of synthesis and degradation in the control of rat liver tryptophan pyrrolase. *J Biol Chem* **240**: 322.

Schnaper H.W., Cole B.R., Hodges F.J., Robson A.M. (1983) Cerebral cortical atrophy in pediatric patients with end-stage renal disease. *Am. J. Kidney Dis.* **2**: 645.

Schneider J.A, Bradley K., Seegmiller J.E. (1967) Increased cystine in leukocytes from individuals homozygous and heterozygous for cystinosis. *Science.* **157**:1321.

Shulman L. (1990) The eosinophilia-myalgia syndrome associated with ingestion of L-tryptophan (editorial). *Arthritis Rheum* **33**: 913 – 917.

Schulman J.D., Bradley K.H. (1973) *In vitro* studies on cystinosis. In Cystinosis. Schulman J.D., editor. DHEW publication n^o 72 – 249. National Institutes of Health , Bethesda, MD. 131 –132.



Schulman J.D. (1971) Cystine storage disease: Investigations at the cellular and subcellular levels, in Carson N.A.J., Raine D.N. (eds): *Inherited Disorders of Sulphur Metabolism*. Edinburgh, Churchill Livingstone, p 123.

Scotto J.M., Stralin H.G. (1977) Ultrastructure of the liver in a case of childhood cystinosis. *Virchows Arch. [Pathol Anat]* **377**: 43.

Scriver C.R. and Kaufman S. (2001) Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine hydroxylase deficiency. Scriver C.R., Beaudet A. L., Sly W.S. and Valle D., editors. *The metabolic and*

molecular basis of inherited disease, 8^o Ed, Vol. III., New York, McGraw-Hill, p. 1667 – 1724.

Scriver C.R., Beaudet A. L., Sly W.S. and Valle D., editors (2001). *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 8^o Ed, Vol. III., New York, McGraw-Hill.

Seegmiller J.E., Friedmann T., Harrison H.E., Wong V., Schneider J.A. (1968) Cystinosis. Combined clinical staff conference at the National Institutes of Health. *Ann. Intern. Med.* **68**: 883.

Shotelersuk V., Larson D., Anikster Y., McDowell G., Lemons R., Bernardini I., Guo J., Thoene J., Gahl W.A. (1998) *CTNS* mutations in an American-based population of cystinosis patients. *Am J Hum Genet* **63**: 1352 – 1362.

Silver R.M., McKinley K., Smith E.A., Quearray B., Harats Y., Sterenberg E.M., Heyes M.P. (1992) Tryptophan metabolism via the kynurenine pathway in patients with the eosinophilia-myalgia syndrome. *Arthritis Rheum* **35**: 1097 – 1105.

Smith I., Beasley M. G., Ades A.E.(1990) Intelligence and quality of dietary treatment in phenylketonuria. *Arch. Dis. Child.* **65**: 472 – 478.

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

Snedden W., Mellor C.S. e Martin J.R. (1983) Familial hypertryptophanemia, tryptophanuria and indolketonuria. *Clin Chim Acta*. **131**: 247 – 256.

Sonies B.C., Ekman E.F., Andersson H.C., Adamson M.D., Kaler S.G., Markello T.C., Gahl W.A. (1990) Swallowing dysfunction in nephropathic cystinosis. *N Engl J Med* **323**: 565 – 570.

Spears, G S, Gubler, M C, Habib, R, and Broyer, M (1989). Dark cells of cystinosis: occurrence in renal allografts, *Hum. Pathol.* 20, 472-476.

Spears G.S., Slusser R.J., Tousimis A. J., Taylor C.G., Schulman J.D. (1971) Cystinosis: An ultrastructural and electron-probe study of the kidney with unusual findings. *Arch. Pathol.* **9**: 206.

Srivastava L. K., Baquer N. Z.(1985) Purification and properties of rat brain pyruvate kinase, *Arch. Biochem. and Biophysics.* **236**: 703 –713.

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

Streck E.L., Matte C., Vieira P.S., Rombaldi F., Wannmacher C.M.D., Wajner M., Wyse A.T. (2002) Redustion of Na⁺, K⁺ - ATPase activity in hippocampus of rats subjected to chemically induced hyperhomocysteinemia. *Neurol. Res.* **27**: 1593 – 1598.

Swanson R.A., Shiraishi K., Morton M.T., Sharp F.R. (1990) Methionine sulfoximine reduces costical infarct size in rats after middle cerebral artery occlusion. *Stroke*. **21**: 322-327.

Tada K., Ito H. Wada Y., Arakawa T. (1963) Congenital tryptophanuria with dwarfism ("H" disease-like clinical features without indicanuria and generalized aminoaciduria): A probably new inborn error of tryptofano metabolism. *Tohoku j Exp Med* **80**: 118 – 134.

Terlecki G. (1989) Purification and properties of pyruvate kinase M₁ from bovine brain, *Int. J. Biochem.* **21**: 1053 – 1060.

Thoene J.G., and Lemons R.N. (1982) Cystine accumulation in cystinotic fibroblasts from free and protein-linked cystine but not cysteine. *Biochem. J.* **208**: 823 –830.

Thoene J.G., and Lemons R.N. (1980) Modulation of the intracellular cystine content of cystinotic fibroblasts by extracellular albumine. *Pediatr. Res.* **14**: 785 – 787.

Thoene J., Oshima R.G., Ritchie D.G., Schneider J.A. (1977) Cystinotic fibroblasts accumulate cystine from intracellular protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 4505 – 4507.

Thoene J., Oshima R., Crawhall J., Olson D., Schneider J. (1976) Cystinosis: Intracellular cystine depletion by aminothiols in vitro and vivo. *J Clin Invest* **58**: 180 – 189.

Tholey G., Roth-Schechter B.F., Mandel P. (1981) Activity and isoenzyme pattern of lactate dehydrogenase in neurons and astroblasts cultured from brains of chick embryos. *J. Neurochem.* **36**: 77 – 81.

Tietze F., Khon L.D., Khon A.D., Bernardini I., Anderson H.C., Adamson M.D., Harper G.S., and Gahl W.A. (1989) Carrier-mediated transport of monoiodotyrosine out of thyroid cell lysosomes. *J. Biol. Chem.* **264**: 4762 – 4765.

Tietze F. (1973) Enzymatic reduction of cystine and other disulfides. *In* Cystinosis. Schulman J.D., editor. DHEW publications N° 72 – 249. National Institutes of Health, Bethesda, M.D. 147 – 197.

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

Venkov L., Rosental L., Manolova M. (1976) Subcellular distribution of LDH isoenzymes in neuronal and glial-enriched fractions. *Brain Res.* **109**: 323 – 333.

Vogel D.G., Malekzadeh M.H., Cornford M.E., Schneider J.A., Shields W.D., Vinters H.V. (1990) Central nervous system involvement in nephropathic cystinosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **49**: 591.

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

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

Weissbach H., King HW., Sjoerdsma A., Udenfriend S. (1959) Formation of indole-3-acetic acid and tryptamine in animals. *J Biol Chem* **234**: 81.

Whrich J.H.H., Stoepler L., Offner G., Brodehl J. (1979) Evidence for cerebral involvement in nephropathic cystinosis. *Neuropediatric*. **10**: 128.

Wong P.W.K., Forman P., Tabahuff B., Justice P. (1976) A defect in tryptophan metabolism. *Pediatr Res* **10**: 725 – 730.

Wooll J.O., Friesen R.H.E., White M.A., Watowich S.J., Fox R., Lee J.C and Czerwinski E.W. (2001) Structural and functional linkages between subunit interfaces in mammalian pyruvate kinase. *J. Mol. Biol.* **312**: 525-540.

Wyse A.T.S., Wajner M., Wannmacher C.M.D. (1998) Kinetics of alanine reversal on the inhibition of Na^+ , K^+ - ATPase activity by phenylalanine and phenyllactate in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats. *Med. Sci. Res.***26**: 141 – 143.

Wyse A.T.S., Bolognese G., Brusque A.M., Wajner M., Wannmacher C.M.D. (1995) Na^+ , K^+ - ATPase activity in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats subjected to chemically induced phenylketonuria. *Med. Sci. Res.***23**: 261 – 262.

* Wyse A.T.S., Wajner M., Brusque A.M., Wannmacher C.M.D. (1995) Alanine reverses the inhibitory effect of phenylalanine and its metabolites on Na^+ , K^+ - ATPase synaptic plasma membranes from cerebral cortex of rats. *Biochem. Soc. Trans.* **23**: 227 S.