

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO DE BIOMEDICINA**

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA L-SERINA SOBRE ALGUNS
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E DE METABOLISMO
ENERGÉTICO EM RATOS JOVENS**

Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina

NARIÉLLE FERNER BONORINO

Orientador: Dr. Clóvis Milton Duval Wanmacher

Co-orientador: MSc. Tanise Gemelli

Porto Alegre, julho de 2012.

Brasil

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO DE BIOMEDICINA**

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA L-SERINA SOBRE ALGUNS
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E DE METABOLISMO
ENERGÉTICO EM RATOS JOVENS**

Trabalho de Conclusão de Curso em
Biomedicina submetido à Comissão de
Graduação de Biomedicina como um dos
requisitos para a obtenção do Grau de
Biomédico.

Aluna: Nariéle Ferner Bonorino

Orientador: Dr. Clóvis Milton Duval Wanmacher

Co-orientador: MSc. Tanise Gemelli

Porto Alegre, julho de 2012.

Brasil

*Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende.*

Leonardo da Vinci

*Dedico este trabalho àqueles que acreditaram e continuarão acreditando em mim,
àqueles que me apoiaram e que continuarão sempre me apoiando:*

Deus, meus pais, meu padrasto e à minha irmã Carlize.

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador Prof. Clóvis pela oportunidade e confiança;

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Rodrigo, Tanise, Deni, Iti, Elenara, Bruna, Thales, Vivi pelo acolhimento, pela amizade e paciência, pelos ensinamentos, pelas dicas, mas em especial pelas risadas e pelo bom convívio tanto no laboratório quanto numa mesa de bar;

À minha amiga Tantan pela confiança, pelo carinho, por agüentar minhas angústias e aflições, minha impaciência, e principalmente pelo apoio moral e conforto de suas palavras: “isso ta ficando ótimo!” quando tudo já parecia perdido;

À Degliane, Cintia e Mariéli, minhas melhores e mais antigas amigas pela compreensão, pelo carinho, pelas palavras de apoio e conforto, mas em especial pelas inúmeras gargalhadas e “borracheiras”, vocês fazem da minha vida uma eterna felicidade;

Às minhas amigas e colegas de faculdade, Renata, Jordana, Maira e Maysa por nunca permitir que eu desistisse, mostrando que sempre há uma luz no fim do túnel, pelo companheirismo e por terem me proporcionado momentos de muita alegria;

A todos aqueles que fizeram ou fazem parte dessa árdua trajetória e que de alguma forma me incentivaram e apoiaram em algum momento;

A todos os meus amados tios, primos, sobrinhos (as), cunhados (as) e avós (in memoriam), por me ensinarem o significado das palavras: união, amor e família;

E por último e mais importante, à minha querida e preciosa família, meu pai Carlos, meu padrasto Ribas, à minha irmã Marcelle, e meu irmão Thayro, mas principalmente à minha mãe Nara e à minha irmã Carlize, por me apoiarem e me incentivarem sempre, por estarem comigo em todos os momentos, ouvirem muitos choros de: “ah meu Deus, não vou passar, vou rodar, sou muito burra”, por me auxiliarem a seguir em frente, pelos ensinamentos, pelo carinho, pelo exemplo de dignidade, honestidade e união, pela dedicação e paciência de cada um de vocês, com certeza sem vocês nada disso seria possível;

À minha mãe em especial por abdicar de suas vontades e sonhos para que o meu se tornasse realidade, e pelo seu amor incondicional.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	7
RESUMO	9
I – Introdução Geral	10
I.1 L-serina	10
I.2 Estresse Oxidativo	12
I.3 Metabolismo Energético	14
I.3.1 Creatinaquinase (CK)	15
I.3.2 Adenilatoquinase (AK)	16
I.3.3 Piruvatoquinase (PK)	17
I.4 Objetivos	18
II – TRABALHO EXPERIMENTAL/ ARTIGO CIENTIFÍCO	19
Resumo	21
Introdução	22
Materiais e Métodos	24
Resultados	30
Discussão	30
Tabelas	36
Referências Bibliográficas	37
III – CONCLUSÃO	42
IV – PERSPECTIVAS	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS	44

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADP** Adenosina difosfato
- AK** Adenilatoquinase
- AMP** Adenosina monofosfato
- ATP** Adenosina trifosfato
- BHE** Barreira hematoencefálica
- CK** Creatinaquinase
- CAT** Catalase
- DCF** 2', 7' diclorofluoresceína
- DCFH-DA** 2',7' diclorofluoresceína diacetato
- DNPH** Dinitrofenilhidrazina
- DTNB** Ácido ditionitrobenzóico
- EDTA** Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ER** Espécies reativas
- ERO** Espécies Reativas de Oxigênio
- ERON** Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio
- FADH₂** Flavina-adenina dinucleotídeo forma reduzida
- G6PD** Glicose-6-fosfato desidrogenase
- GSH** Glutathiona reduzida
- HK** Hexoquinase
- LDH** Lactato desidrogenase
- MPA** Ácido metafosfórico

NAD⁺ Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo forma oxidada

NADH Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo forma reduzida

NADP⁺ Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato forma oxidada

O²⁻ Ânion superóxido

OH• Radical hidroxila

OPT O-phtaldehyde

PEP Fosfoenolpiruvato

PBS Tampão Fosfato-Salina

PGDH 3-Fosfoglicerato desidrogenase

PSAT Fosfohidroxipiruvato aminotransferase

PSPH Fosfoserinafosfatase

RPM Rotação por minuto

SNC Sistema Nervoso Central

SOD Superóxido dismutase

TBA-RS Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TNB Ácido Tionitrobenzóico

RESUMO

A deficiência da enzima 3-fosfoglicerato desidrogenase (PGDH) é um erro inato do metabolismo, que tem como principal manifestação bioquímica a baixa concentração de L-serina no plasma e fluido cerebrospinal, resultando no desequilíbrio deste aminoácido que é um importante precursor de uma série de outros compostos como D-serina, glicina, cisteína, esfingomielina, serinafosfolipídeos e cerebrosídeos. Indivíduos com essa desordem metabólica caracterizam-se por nascerem com microcefalia ou a desenvolverem rapidamente durante as três primeiras semanas pós-nascimento, com subsequente retardo psicomotor, retardo no crescimento, e aparecimento de convulsões no primeiro ano de vida. O tratamento baseia-se na administração de altas doses de L-serina. Portanto, em virtude do escasso conhecimento sobre os efeitos colaterais que doses excessivas de determinados aminoácidos podem causar ao organismo, entre eles a L-serina, no presente trabalho foram investigados os efeitos da administração de L-serina em córtex cerebral de ratos Wistar jovens sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo energético. Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo avaliados, houve aumento na oxidação do conteúdo de 2', 7' diclorofluoresceína, na atividade da superóxido dismutase (SOD), na atividade da catalase (CAT), na presença de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS), na glutatona (GSH) e no conteúdo total de sulfidrilas. Em relação às enzimas do metabolismo energético houve aumento significativo da atividade das enzimas adenilatoquinase (AK), creatinaquinase (CK) mitocondrial e citosólica, sem alteração da atividade da piruvatoquinase (PK). Portanto, estes resultados sugerem que a administração de L-serina deve ser realizada com cautela.

I - Introdução

I.1 - L-Serina

L-serina é classificada como um aminoácido não-essencial contendo em sua cadeia lateral um grupo hidroximetil (HOCH_2-). Esse aminoácido pode ser derivado de inúmeras fontes como: do 3-fosfoglicerato, um intermediário da via glicolítica; da glicina, através da reação reversível catalisada pela serina hidroximetiltransferase; e também através da degradação de proteínas e lipídeos (Koning 2006). A L-serina é fundamental para a síntese de proteínas, além de servir como precursora de uma série de outros compostos como glicina, D-serina, cisteína, esfingomiéline, serinafosfolípidos e cerebrosídeos (Jaeken et al. 1996).

Durante as diferentes fases do desenvolvimento humano é muito provável que a fonte predominante de L-serina varie em diferentes tecidos, sendo o 3-fosfoglicerato, a principal fonte de L-serina no cérebro através de três sucessivas reações (figura 1) (Hirabayashi e Furuya 2008) na primeira, ocorre a oxidação da 3-fosfoglicerato pela 3-fosfoglicerato desidrogenase - PGDH (EC 1.1.1.95) que utiliza NAD^+ para então formar 3-fosfohidroxipiruvato; na segunda, 3-fosfohidroxipiruvato é convertido a fosfoserina através da reação de transaminação catalisada pela 3-fosfohidroxipiruvato aminotransferase - PSAT (EC 2.6.1.52) utilizando glutamato como doador de nitrogênio; na terceira, a 3-fosfoserina fosfatase - PSPH (EC 3.1.3.3) desfosforila a fosfoserina produzindo L-serina (Hirabayashi e Furuya 2008). Contudo, a expressão dessas enzimas varia conforme o tipo de célula, o mRNA da PGDH é expresso em grande quantidade nas células da glia e pouco detectado em neurônios (Furuya et al. 2000; Yamasaki et al. 2001), já o mRNA das outras duas enzimas PSAT e PSPH que também participam do processo são expressos em ambos os tipos de células (Shimizu et al. 2004). Estudos (Tabatabaie et al. 2010; Hirabayashi e Furuya 2008; Yamasaki et al. 2001) também demonstram que a expressão de tais enzimas é alterada ao longo do desenvolvimento do SNC, ou seja, durante o desenvolvimento fetal a enzima PGDH está fortemente expressa em neurônios enquanto que no cérebro já desenvolvido (maduro), a L-serina é predominantemente sintetizada pelas células da glia que liberam uma grande quantidade de L-serina para suprir também as necessidades dos neurônios na síntese de esfingolípidos. Tais dados reforçam a relação de L-serina com o

desenvolvimento e funcionamento do Sistema Nervoso Central – SNC, devido à síntese de fosfolípidos e esfingolípideos estar intimamente vinculada à presença de L-serina (Tabatabaie et al. 2010; Koning et al. 2006).

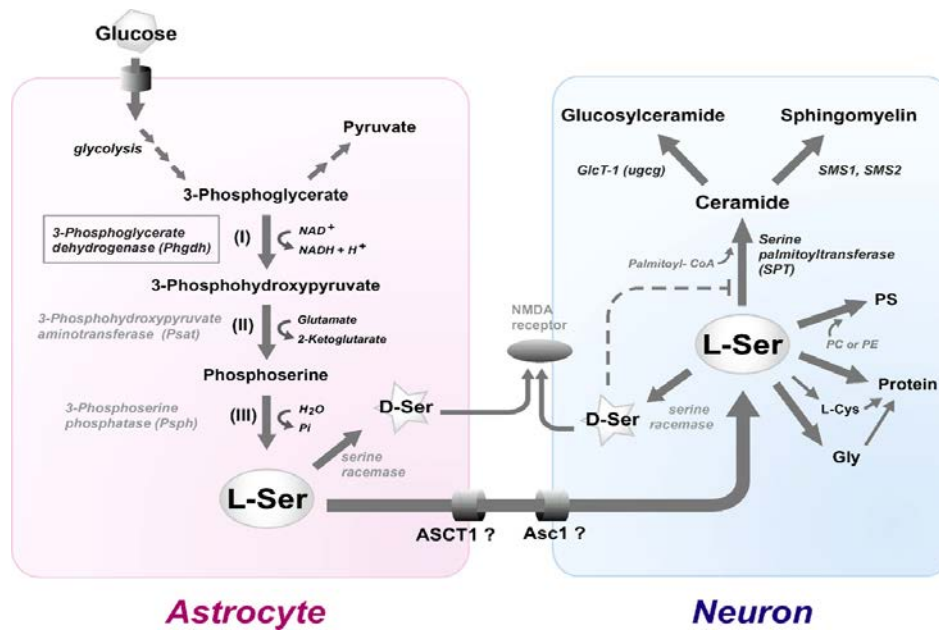


Figura 1: Interação metabólica entre neurônio e glia. Neurônios não podem sintetizar L-serina. L-serina exógena estimula a síntese de esfingolípideos e fosfolípidos (PS/PE) em neurônios. Retirado de “Roles of L-serine and sphingolipid synthesis in brain development and neuronal survival”. (Hirabayashi e Furuya 2008)

Entretanto, há casos na literatura que reportam a deficiência da enzima da primeira etapa da síntese de L-serina, a PGDH. Tal deficiência é considerada um erro inato do metabolismo devido à deficiência total ou parcial da enzima, gerando um desequilíbrio na biossíntese de L-serina afetando principalmente o SNC (Jaeken et al. 1996; Koning 2006), esta desordem é caracterizada pela baixa concentração de L-serina e em menor grau de glicina, no plasma e no fluído cerebrospinal (CSF) (Tabatabaie et al. 2010; Koning et al. 2006). Análises revelaram baixas concentrações em jejum de L-serina e glicina tanto no plasma (29-55 $\mu\text{mol/l}$ e 77-97 $\mu\text{mol/l}$), quanto no CSF (6 $\mu\text{mol/l}$ e 2,8 $\mu\text{mol/l}$), valores de referência estão descritos na tabela 1. (Jaeken et al. 1996).

Tabela 1. Valores de Referência.

	Plasma	Fluído Cerebroespinal
L-Serina ($\mu\text{mol/L}$)	70-187	35-80
Glicina ($\mu\text{mol/L}$)	80-341	3,6-9,0

Dados retirados: "3-Phosphoglycerate dehydrogenase deficiency: an inborn error of serine biosynthesis."
(Jaeken et al. 1996).

Indivíduos diagnosticados com essa rara deficiência nascem com microcefalia ou a desenvolvem rapidamente durante as três primeiras semanas, com subsequente retardo psicomotor, retardo no crescimento, e aparecimento de convulsões no primeiro ano de vida (Sugishita et al. 2001, Koning e Klomp 2004). O tratamento pós-natal baseia-se na administração de doses de L-serina, às vezes combinada com glicina se necessário, levando à redução significativa da frequência das convulsões, contudo, após um tempo de tratamento, percebe-se que nem todos aqueles pacientes que foram submetidos permaneceram livres das convulsões e dos outros sintomas neurológicos, nem mesmo após reajustes das doses (Koning 2006).

Conforme Koning e colaboradores (1998) são necessárias elevadas doses de L-serina e glicina para que ocorra o transporte de uma quantidade significativa de ambos os aminoácidos através da barreira hematoencefálica - BHE, isso devido à alta competitividade com outros aminoácidos que utilizam o mesmo transportador da L-serina (Häusler et al. 2001).

Então, com essa necessidade de administrar altas doses de aminoácidos individuais para finalidade terapêutica, surgiu o interesse em garantir uma ingestão segura de quaisquer aminoácidos, pois até o momento pouco se sabe sobre os seus efeitos na administração a longo ou curto prazo de doses excessivas de determinados aminoácidos, como L-serina. (Kaneko et al. 2009).

I.2 - Estresse Oxidativo

Estresse oxidativo ocorre quando a taxa de produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (ERON) os chamados oxidantes, ultrapassa a taxa de remoção pelos mecanismos de defesa celular, conhecidos como antioxidantes (Marks et al. 2007). Em situações normais, a produção de ERO e ERON é balanceada pelos sistemas de defesas antioxidantes

celular, havendo um desequilíbrio nesse balanço que favoreça as espécies reativas haverá como consequência dano celular, que pode atingir lipídeos, carboidratos, proteínas e o DNA entre outros componentes (Sies 1997). Ainda, segundo Halliwell e Gutteridge (2007) “o estresse oxidativo pode ser atribuído a uma produção aumentada das espécies reativas (ER) e/ou de uma diminuição dos antioxidantes favorecendo o acúmulo das ERO/RNOS e conseqüentemente os danos celulares.”

O oxigênio é uma molécula essencial no metabolismo aeróbico devido a sua participação nas reações de oxidação das rotas de geração de adenosina-trifosfato (ATP), detoxificação e síntese; mas ao mesmo tempo pode ser tóxico, ao aceitar através de inúmeros processos enzimáticos ou não-enzimáticos, um único elétron formando radicais de oxigênio altamente reativos, chamados de ERO que danificam importantes componentes celulares. Além dos radicais de oxigênio, existe também o radical livre óxido nítrico (NO) que quando combinado com O_2 ou com superóxido forma as ERON (Marks et al. 2007). As principais ERO distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila (OH^\bullet), superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^\bullet) e alcoxila (RO^\bullet); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso. Já dentre as ERON se destacam o óxido nítrico (NO^\bullet), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos ($ONOO^-$) (Barreiros e David 2006).

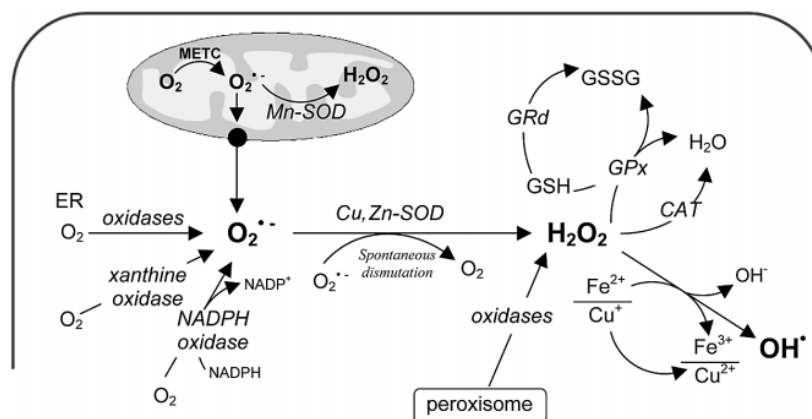


Figure 2: Formação de espécies reativas de oxigênio e as suas respectivas defesas antioxidantes. O_2^\bullet , radical superóxido; H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; OH^\bullet , radical hidroxil; METC, cadeia de transferência de elétrons mitocondrial; GSH, glutationa; GSSG, glutationa oxidada; Cu, Zn-SOD, Cu,Zn-superóxido dismutase; Mn-SOD, Mn-superóxido dismutase; GPx, glutationa peroxidase; GRd, glutationa redutase; CAT, catalase; ER, retículo endoplasmático. Retirado de “The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: Insights from animal studies.” (Wajner et al. 2004)

O excesso de tais ER no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. *“Antioxidante é considerado qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”* conforme Halliwell (2000). Os antioxidantes endógenos agem enzimaticamente, a exemplo da GPx, CAT e SOD ou, não-enzimaticamente a exemplo de GSH, peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido diidrolipóico e CoQH. Além desses antioxidantes, o organismo também utiliza aqueles provenientes da dieta, como o α -tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (pró-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (Barreiros e David 2006).

Todos os organismos aeróbios estão susceptíveis aos danos oxidativos, sendo estes danos muitas vezes os responsáveis por uma variedade de doenças, incluindo algumas que afetam o SNC, que é o mais sensível em comparação aos outros sistemas, devido ao alto consumo de oxigênio pelo cérebro humano (Halliwell e Gutteridge 2007; Behl e Moosmann 2002), à grande quantidade de lipídeos insaturados na sua composição, deficiência em mecanismos de proteção contra as ER e concentrações elevadas de ferro que favorecem a reação de Fenton em determinadas áreas do cérebro (Reznick e Packer 1993). Essa reação de Fenton assim como a reação de Haber-Weiss tem a capacidade de gerar o radical $\text{OH}\cdot$ através de reações não-enzimáticas que utilizam o H_2O_2 . Na reação de Haber-Weiss o H_2O_2 pode reagir com $\text{O}_2\cdot^-$ formando radical $\text{OH}\cdot$, já na reação de Fenton o H_2O_2 reage com Fe^{2+} para formar o radical $\text{OH}\cdot$ (Marks et al. 2007).

I.3 - Metabolismo Energético

Para manter a atividade celular é necessário um grande aporte de energia. Essa demanda energética é fornecida pela rápida geração de ATP (tanto na mitocôndria, como no citosol), que é uma molécula de alta energia, através de processos metabólicos como a via glicolítica, ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa (Noma 2005). A energia armazenada nas ligações de ATP pode ser prontamente utilizada, convertendo ATP em ADP mais um fosfato inorgânico ou ao AMP e dois fosfatos inorgânicos. Nas células as concentrações de ATP, ADP e AMP são

respectivamente 5, 1 e 0,1 mM. Qualquer alteração nessas concentrações pode modificar a atividade de enzimas fundamentais em rotas biossintéticas e oxidativas, que percebem mudanças no metabolismo energético celular. (Noma 2005; Figueiredo 2008).

A simples difusão dos nucleotídeos de adenina não é suficiente para manter a homeostase energética. O fluxo de energia na célula é então mantido principalmente pelo mecanismo conhecido como rede de transferência de fosfato, do qual fazem parte as enzimas adenilatoquinase (AK), creatinaquinase (CK) e enzimas glicolíticas como a piruvatoquinase (PK) (Noma 2005; Dzeja et al. 1996; Figueiredo 2008).

I.3.1 - Creatinaquinase (CK)

A creatinaquinase (EC-2.7.3.2) é uma importante enzima do metabolismo energético celular que realiza a transferência reversível de um grupo fosforil da molécula de ATP para a creatina (Furter et al. 1993).

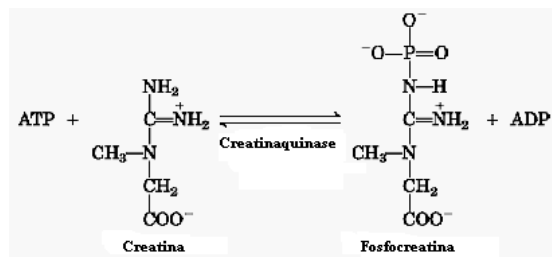


Figura 3: Reação reversível da creatinaquinase (CK). Fonte: Nelson et al. 2011.

A CK existe em diferentes isoformas que são codificadas por genes individuais. A expressão dessas isoformas é regulada de maneira temporal e específica para cada tecido, sendo que a localização subcelular é também específica para cada isoforma (Wallimann et al. 1992; Furter et al. 1993).

Há quatro principais isoenzimas da CK cujos nomes são dados em função dos tecidos em que foram historicamente isoladas, duas das quais são encontradas no citosol, a CK muscular (CK-MM) e a CK cerebral (CK-BB), ambas existindo como homodímeros sob condições fisiológicas, podendo se apresentar como um heterodímero CK-MB no coração. E as outras duas localizadas na mitocôndria, na forma ubíqua (CK-Miu) e a sarcomérica (CK-Mis), as quais são expressas predominantemente no cérebro e no músculo estriado, respectivamente (Walliman et al. 1992).

As isoenzimas da CK citosólica (CK MM-, MB- e BB-) são sempre co-expressadas em tecido específico junto com a isoforma mitocondrial. A interação entre essas tais isoformas é de vital importância na homeostasia energética celular (Silva et al. 2003).

I.3.2 - Adenilatoquinase (AK)

A adenilatoquinase (EC 2.7.4.3) inicialmente conhecida como mioquinase, por ser encontrada com mais facilidade e maior concentração em células musculares (Figueiredo 2008), é uma fosfotransferase com uma única cadeia polipeptídica de aproximadamente 200 aminoácidos que catalisa a interconversão de nucleotídeos adenina, e desempenha um papel importante na homeostase da energia celular (Dzeja et al. 1999). Durante os períodos de intensa utilização de ATP, a célula diminui a concentração de ADP para repor os níveis de ATP através da reação reversível da enzima adenilatoquinase (figura 4) (Nelson et al. 2011), que tem habilidade de regenerar ATP a partir de 2 ADP, potencializando o papel energético do ATP. A AK também pode gerar sinais metabólicos para a célula, como o AMP, ativando rotas dependentes de AMP (Dzeja et al. 2002).

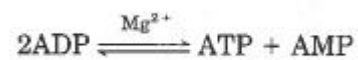


Figura 4: Reação reversível da adenilatoquinase. Fonte: Nelson et al. 2011.

Até o momento foram identificadas seis isoenzimas (AK1 a AK6) sendo elas compartimentalizadas e distribuídas em tecidos diferentes. AK1 e AK5 são proteínas do citoplasma, AK1 é encontrada nos processos neuronais, cauda de espermatozóides e em altas concentrações no citoesqueleto das células cardíacas. AK5 é expressa exclusivamente em uma área limitada do cérebro. AK2, AK3 e AK4 são proteínas mitocondriais, AK2 é expressa no espaço intermembrana, enquanto AK3 e AK4 estão localizadas na matriz mitocondrial. AK3 é encontrada em todas as células exceto nos glóbulos vermelhos e devido a sua localização onde há a formação de GTP no ciclo do ácido cítrico esta isoenzima utiliza GTP para formação de GDP ou ADP. AK4 é expressa principalmente nos rins, no cérebro, coração e fígado. AK6 é a única encontrada no núcleo celular (Noma 2005).

I.3.3 - Piruvatoquinase (PK)

A enzima piruvatoquinase (EC 2.7.1.40) faz parte da última etapa da via glicolítica, catalisando a transferência irreversível de um grupo fosforil do fosfoenolpiruvato (PEP) para ADP utilizando K^+ e Mg^{2+} ou Mn^{2+} para realizar a reação que tem como produto final piruvato e ATP (figura 5) (Nelson et al. 2011).

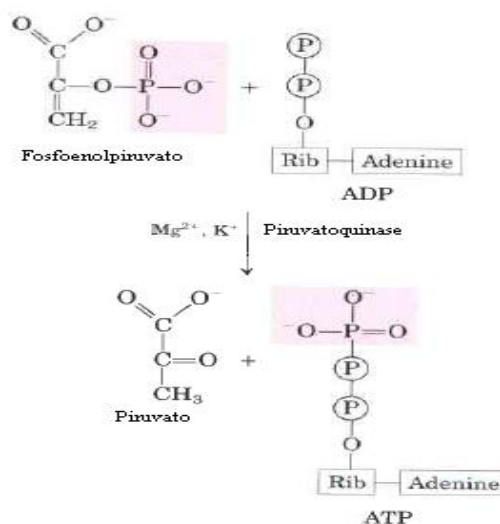


Figura 5: Reação catalisada pela piruvatoquinase. Fonte: Nelson et al. 2011.

A via glicolítica é um sistema fundamental para o metabolismo energético nos organismos, por este motivo as enzimas glicolíticas estão presentes em todas as células ou tecidos dos mamíferos (Heyduk et al. 1992). Entretanto, cada tipo de tecido utiliza essas enzimas de uma maneira específica para seu metabolismo (Friesen et al. 1998). Até o momento, são conhecidas quatro isoformas diferentes da PK, denominadas como L (no fígado), M1 (no cérebro e músculo), M2 (nos rins) e R (nos eritrócitos) (Cheng et al. 1996), estas isoformas diferem em propriedades química, física, cinética, eletrosférica, imunológica e na sua distribuição nos tecidos (Hall e Cottam 1978).

A manutenção do fluxo de energia e de nutrientes para dentro da célula é essencial para a homeostasia e o funcionamento celular. Nesse contexto a PK de mamíferos desempenha um papel fundamental nas células eucarióticas (Consler et al. 1992), juntamente com as enzimas AK e CK.

I.4 - Objetivos

Considerando que a L-serina atravessa a BHE, penetrando no cérebro onde exerce vários efeitos metabólicos, e onde sua administração pode ser acompanhada de efeitos colaterais desconhecidos, o principal objetivo do presente estudo foi investigar o efeito da administração de L-serina sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo energético de ratos Wistar jovens.

Para avaliar a presença de estresse oxidativo os seguintes parâmetros foram investigados: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS, Determinação do conteúdo total de tióis, Conteúdo de Glutathiona reduzida – GSH, Conteúdo de 2', 7' diclorofluoresceína e defesas antioxidantes enzimáticas (Catalase – CAT, Superóxido Dismutase – SOD).

Para o metabolismo energético foram determinadas as atividades das enzimas PK, AK e CK citosólica e mitocondrial.

II - TRABALHO EXPERIMENTAL/ARTIGO CIENTÍFICO

Intenção de submissão ao periódico:

“Metabolic Brain Disease”

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA L-SERINA SOBRE ALGUNS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E DE METABOLISMO ENERGÉTICO EM RATOS JOVENS

Nariéle Ferner Bonorino, Bruna May, Tanise Gemelli, Clóvis Milton Duval
Wannmacher

Efeito da Administração da L-serina Sobre Alguns Parâmetros de Estresse Oxidativo e de Metabolismo Energético em Ratos Jovens

Nariéle Ferner Bonorino, Bruna May, Tanise Gemelli, Clóvis Milton Duval Wannmacher MD, PhD.

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600, CEP 90.035-003, RS, Brasil;

*Corresponding author: Clovis Milton Duval Wannmacher. Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2600, CEP 90.035-003, RS, Brazil

Fax 55 51 33085535,

E-mail clovisdw@ufrgs.br

Resumo

A deficiência da enzima 3-fosfoglicerato desidrogenase (PGDH) é um erro inato do metabolismo, que tem como principal manifestação bioquímica a baixa concentração de L-serina no plasma e fluido cerebrospinal, resultando no desequilíbrio deste aminoácido que é um importante precursor de uma série de outros compostos como D-serina, glicina, cisteína, esfingomiéline, serinafosfolipídeos e cerebrosídeos. Indivíduos com essa desordem metabólica caracterizam-se por nascerem com microcefalia ou a desenvolverem rapidamente durante as três primeiras semanas pós-nascimento, com subsequente retardo psicomotor, retardo no crescimento e aparecimento de convulsões no primeiro ano de vida. O tratamento baseia-se na administração de altas doses de L-serina. Portanto, em virtude do escasso conhecimento sobre os efeitos colaterais que doses excessivas de determinados aminoácidos podem causar ao organismo, entre eles a L-serina, no presente trabalho foram investigados os efeitos da administração de L-serina em córtex cerebral de ratos Wistar jovens sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo energético. Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo avaliados, houve aumento na oxidação do conteúdo de 2', 7' diclorofluoresceína, na atividade da superóxido dismutase (SOD), na atividade da catalase (CAT), na presença de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS), na glutatona (GSH) e no conteúdo total de sulfidrilas. Em relação às enzimas do metabolismo energético houve aumento significativo da atividade das enzimas adenilatoquinase (AK), creatinaquinase (CK) mitocondrial e citosólica, sem alteração da atividade da piruvatoquinase (PK). Portanto, estes resultados sugerem que a administração de L-serina deve ser realizada com cautela.

Palavras-chave: L-serina, estresse oxidativo, metabolismo energético, córtex cerebral.

Introdução

L-serina é classificada como um aminoácido não-essencial, podendo ser derivada de inúmeras fontes como: do 3-fosfoglicerato, um intermediário da via glicolítica; da glicina, através da reação reversível catalisada pela serina hidroximetiltransferase e também através da degradação de proteínas e lipídeos (Koning 2006). A L-serina é fundamental para a síntese de proteínas, além de servir como precursora de uma série de outros compostos como glicina, D-serina, cisteína, esfingomielina, serinafosfolídeos e cerebrosídeos (Jaeken et al. 1996). Durante as diferentes fases do desenvolvimento humano é muito provável que a fonte predominante de L-serina varie em diferentes tecidos, sendo o 3-fosfoglicerato, a principal fonte de L-serina no cérebro através de três sucessivas reações (Hirabayashi e Furuya 2008) realizadas pelas enzimas 3-fosfoglicerato desidrogenase - PGDH (EC 1.1.1.95), 3-fosfohidroxipiruvato aminotransferase - PSAT (EC 2.6.1.52) e a 3-fosfoserina fosfatase - PSPH (EC 3.1.3.3) (Jaeken et al. 1996). Contudo, a expressão dessas enzimas varia conforme o tipo de célula. O mRNA da PGDH é expresso em grande quantidade nas células da glia e pouco detectado em neurônios (Furuya et al. 2000; Yamasaki et al. 2001). Já o mRNA das outras duas enzimas PSAT e PSPH que também participam do processo são expressos em ambos os tipos de células (Shimizu et al. 2004). Estudos demonstram que a expressão de tais enzimas é alterada ao longo do desenvolvimento do SNC, ou seja, durante o desenvolvimento fetal a enzima PGDH está fortemente expressa em neurônios enquanto que no cérebro já desenvolvido (maduro) a L-serina é predominantemente sintetizada pelas células da glia que liberam uma grande quantidade de L-serina para suprir também as necessidades dos neurônios na síntese de esfingolípídeos (Tabatabaie et al. 2010; Hirabayashi e Furuya 2008; Koning et al. 2006; Yamasaki et al. 2001).

Entretanto, há casos na literatura que reportam a deficiência da enzima da primeira etapa da síntese de L-serina, a PGDH. Tal deficiência é considerada um erro inato do metabolismo devido à deficiência total ou parcial da enzima, gerando um desequilíbrio na biosíntese de L-serina afetando principalmente o SNC (Jaeken et al. 1996; Koning 2006). Esta desordem é caracterizada pela baixa concentração de L-serina e em menor grau de glicina, no plasma e no fluido cerebrospinal (Tabatabaie et al. 2010). Indivíduos diagnosticados com essa rara deficiência nascem

com microcefalia ou a desenvolvem rapidamente durante as três primeiras semanas de vida, com subsequente retardo psicomotor, retardo no crescimento e aparecimento de convulsões no primeiro ano de vida (Sugishita et al. 2001). O tratamento pós-natal baseia-se na administração de altas doses de L-serina, às vezes combinada com glicina se necessário, levando à redução significativa da frequência das convulsões. Contudo, após um tempo de tratamento, percebe-se que nem todos aqueles pacientes que foram submetidos permaneceram livres das convulsões e dos outros sintomas neurológicos, nem mesmo após reajustes das doses (Koning 2006).

Conforme Koning et al. (1998) são necessárias elevadas doses de L-serina e glicina para que ocorra o transporte de uma quantidade significativa de ambos os aminoácidos através da barreira hematoencefálica - BHE, isso devido à alta competitividade com outros aminoácidos que utilizam o mesmo transportador da L-serina (Häusler et al. 2001).

Estresse oxidativo ocorre quando a taxa de produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (ERON), os chamados pró-oxidantes, ultrapassa a taxa de remoção pelos mecanismos de defesa celular, conhecidos como antioxidantes (Marks et al. 2007). Recentemente, estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo está possivelmente envolvido em diversas fisiopatologias de erros inatos do metabolismo e de doenças neurodegenerativas. Sabe-se que o cérebro é particularmente vulnerável a danos oxidativos por várias razões, dentre as principais estão as baixas defesas antioxidantes e o alto consumo de oxigênio (Halliwell 2001).

Outras linhas de estudos têm observado que danos no metabolismo energético no cérebro podem também estar associados com desordens neurodegenerativas (Beal et al. 1993; Beal et al. 1995; Hodgkins and Schwarcz 1998). A piruvatoquinase - PK (EC 2.7.1.40), a creatina quinase - CK (EC 2.7.3.2) e a adenilatoquinase - AK (EC 2.7.4.3) são enzimas críticas para o metabolismo energético em quase todos os tecidos de mamíferos e fazem parte de um sistema que auxilia na manutenção da homeostase energética, conhecido como Rede de Transferência de Fosfato (Barreiros e David 2006). Essa rede de transferência de fosfato visa facilitar a distribuição de grupos fosforil entre compartimentos celulares (Dzeja et al. 1999) mantendo o fluxo de energia na célula (Dzeja et al. 1996), devido a capacidade das enzimas AK, CK e PK de regenerar ATP através de suas reações. A PK catalisa uma transferência

irreversível de um grupo fosforil do fosfoenolpiruvato (PEP) para ADP utilizando K^+ e Mg^{2+} ou Mn^{2+} para realizar a reação, formando ATP e piruvato. Já a AK e a CK regeneram ATP através de reações reversíveis, a AK a partir de dois ADP produz ATP e AMP (Nelson et al. 2011) e a CK realiza a transferência reversível de um grupo fosforil da molécula de ATP para a creatina formando fosfocreatina e ADP (Furter et al. 1993).

Observando as elevadas doses necessárias de L-serina e glicina para o tratamento de pacientes diagnosticados com a deficiência da enzima PGDH (Koning et al. 1998) e, portanto considerando que a L-serina atravesse a BHE, penetrando no cérebro, onde exerce importantes efeitos metabólicos, que sua administração em excesso poderia vir acompanhada de efeitos colaterais desconhecidos e, tendo em vista que até o presente momento existem poucos estudos relacionados, o principal objetivo deste estudo será investigar o efeito da administração de L-serina sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo energético em cérebro de ratos Wistar jovens.

Materiais e Métodos

Animais e Reagentes

Para a realização do experimento foram utilizados 28 ratos Wistar com oito dias de vida, nascidos de 6 mães e criados no biotério do departamento de Bioquímica. Os animais tinham livre acesso à água e à ração comercial Supra, contendo 20,5% de proteína (predominantemente de soja com suplementação de metionina), 54% de carboidratos, 4% de lipídios, 4,5% de fibras, 7% cinzas e 10% de umidade. Eles foram mantidos em ciclo claro-escuro de ± 12 horas a uma temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ em caixas com dimensões de 41x34x16cm até a morte. Os animais foram divididos em 4 grupos, em número de 7 em cada grupo, para cada conjunto de experimento (2 conjuntos). O cálculo amostral foi realizado pelo programa MINITAB 15®. A utilização dos animais seguiu o protocolo experimental dos Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (Principles of Laboratory Animal Care, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 80-23, revisada em 1996). Os experimentos estavam de acordo com os preceitos de ética empregados pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Todas as normas de

descarte de resíduos químicos e biológicos estabelecidas pela UFRGS foram rigorosamente seguidas.

Todos os reagentes foram comprados do mesmo fabricante, Sigma (St. Louis, MO, USA). As medições espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro Spectronic Genesys 8, Spectronic Instruments, Rochester, New York, USA.

Tratamento

Vinte e oito ratos Wistar recém-nascidos e suas respectivas mães foram separados aleatoriamente em dois conjuntos, sendo um para avaliar os parâmetros de estresse oxidativo e outro para avaliar a atividade das enzimas do metabolismo energético, cada conjunto contendo um grupo controle e um grupo tratado. O tratamento foi realizado do 8º ao 15º dia de vida, quando todos os animais, provenientes de mães diferentes, receberam via subcutânea três doses diárias de 134 mg/Kg de L-serina, totalizando 402 mg/Kg por dia, similar à dose terapêutica usada em pacientes (Koning 2006), no intervalo de 4hs entre cada administração. Foi injetado nos animais 10µl/g peso corpóreo das soluções de L-serina (grupos tratados) e salina (grupos controles), ambas as soluções com pH 7,4.

Preparação do tecido

No 15º dia de tratamento os ratos foram sacrificados sem anestesia 1 h após a última injeção. O cérebro foi retirado e dissecado sobre uma placa de vidro cuidadosamente alojada sobre gelo. O córtex cerebral foi retirado para posterior homogeneização e centrifugação de acordo com as técnicas a serem realizadas. O restante das estruturas foi descartado.

Para as enzimas do metabolismo energético, após dissecação o córtex cerebral foi lavado com solução salina (0,9%) e em seguida homogeneizado 1:10 (peso/volume) com tampão sacarose (0,32 M sacarose/1mM EGTA/ 10mM Tris-HCl, pH 7,4). Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 800 x g por 10 min a 4°C, o pellet foi descartado, uma alíquota do sobrenadante foi separada para determinar a atividade da AK e o restante foi centrifugado a 10.000 x g por 15 min a 4°C. O sobrenadante desta segunda centrifugação foi utilizado para determinar a atividade da CK-citosólica e da PK. O pellet restante contendo mitocôndrias e fragmentos de membranas foi lavado duas vezes com a mesma solução tampão Tris-Sacarose e em

seguida ressuspendido com 1ml de solução tampão $MgSO_4$ – Trizma 100mM pH 7,5 para determinar a atividade da CK-mitocondrial. As amostras foram armazenadas a $-70^\circ C$ e os ensaios realizados na mesma semana.

Para as técnicas que envolvem o estresse oxidativo, o córtex cerebral foi lavado com solução salina após dissecação e homogeneizado 1:10 (peso/volume) utilizando solução tampão fosfato de sódio 20mM com KCL 140mM, centrifugado a $800 \times g$ por 10 min. a $4^\circ C$, sendo todo o sobrenadante armazenado para posterior análise de parâmetros de estresse oxidativo.

Técnicas de Estresse Oxidativo

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS

As TBA-RS foram determinadas de acordo com Ohkawa (1979). A técnica mede a formação de malondialdeído, produto formado pela lipoperoxidação causada pela ação de ER com lipídeos de membrana. O ácido tiobarbitúrico (TBA) em contato com o malondialdeído aquecido forma um composto de cor rosada que poderá então ser lido espectofotometricamente no $\lambda = 532nm$. As amostras e reagentes foram adicionados em tubos de 1,5 ml na seguinte ordem: 200 μl de tecido homogeneizado; 50 μl de SDS 8,1% (Sodium Dodecyl-Sulphate); 375 μl de solução aquosa de ácido acético 20% (v/v) pH 3.5; 375 μl de ácido tiobarbitúrico 0.8% (TBA). Os tubos foram agitados em vórtex e incubados em banho-fervente com temperatura de $100^\circ C$ por 1h. Após o tempo necessário, os tubos são retirados do banho-fervente, deixando-os esfriar em temperatura ambiente. Em seguida, foram centrifugados a 3500 RPM por 10 min. No espectofotômetro com $\lambda = 532nm$ foi efetuada a leitura do sobrenadante em temperatura ambiente, utilizando cubeta de quartzo. O aparelho foi zerado com água. TBA-RS foi calculada como nmol TBA-RS por mg de proteínas.

Conteúdo total de sulfidrilas

De acordo com Aksenov e Markesbery (2001) este ensaio é baseado na redução de ácido ditionitrobenzóico (DTNB) por tióis presentes nas amostras, gerando um derivado amarelo chamado ácido tionitrobenzóico (TNB) que pode ser lido espectofotometricamente no $\lambda = 412nm$. O conteúdo total de sulfidrilas está

correlacionado inversamente com os danos oxidativos as proteínas e os resultados foram calculados como nmol de TNB por mg de proteínas.

Oxidação de 2',7' dihidroclorofluoresceína (DCFH)

O objetivo deste ensaio é medir a produção inespecífica de ERON através da oxidação do fluorocromo 2',7' diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) que atravessa a membrana das células, onde é desacetilado a DCFH que, então será oxidado a DCF na presença de espécies reativas intracelulares, este poderá ser medido devido à alta fluorescência produzida (Lebel 1992). Em placa, 30µl de tecido homogeneizado foram incubados com 30µl de solução tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 e 240µl de solução DCFH-DA 100mM por 30 min. à 37°C protegidos da luz. A intensidade da fluorescência formada pelo DCF é proporcional a quantidade de espécies reativas presentes nas amostras. Para mensurar essa fluorescência é utilizado comprimento de onda de excitação e emissão de 488nm e 525nm respectivamente. Padrão DCF 1mM (0,25-10µM) foi utilizado para a curva de calibração e os níveis de espécies reativas foram expressos em nmol de DCF formado por mg de proteínas (Lebel 1992).

Conteúdo de Glutathiona Reduzida – GSH

A Glutathiona é uma das principais formas de proteção não-enzimáticas do organismo contra os danos oxidativos. Duas moléculas de GSH juntamente com a enzima Glutathiona Peroxidase (GPx) reduzem o peróxido de hidrogênio a duas moléculas de água e os peróxidos lipídicos a alcoóis não-tóxicos (Marks et al. 2007). Os níveis de GSH foram determinados de acordo com Wendel (1981) e baseia-se na reação de GSH com o fluoróforo o-phtaldehyde (OPT) após as amostras serem desproteinizadas pelo ácido metafosfórico (MPA-RS). Em seguida, 150µl de amostras foram incubadas com o mesmo volume de OPT (1 mg/ml de metanol) por 15 min a 37°C em local escuro. Logo após, a fluorescência foi medida usando o comprimento de onda de excitação de 350nm e emissão de 420nm. A curva de calibração foi delineada com o padrão GSH (1mM) e as concentrações do sobrenadante foram expressas em nmol de GSH por mg de proteínas.

Superóxido Dismutase – SOD

A SOD faz parte dos antioxidantes enzimáticos do organismo, responsável por catalisar a dismutação do radical ânion superóxido $O_2^{\bullet-}$ convertendo-o em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (Barreiros e David 2006). O método utilizado para medir a atividade dessa enzima é baseado no acompanhamento da auto-oxidação do pirogalol no espectrofotômetro a 420nm. Quando presente na amostra, a SOD consome os radicais $O_2^{\bullet-}$, que desta maneira não ficarão mais disponíveis para reagir com o pirogalol, inibindo a auto-oxidação deste reagente. A curva de calibração foi realizada com SOD purificada como padrão. É definido como uma unidade de SOD quando há 50% da inibição da auto-oxidação do pirogalol e a atividade específica foi expressa em unidades de SOD por mg de proteínas (Marklund et al. 1985).

Catalase – CAT

A catalase, juntamente com a enzima GPx e a molécula GSH, auxilia na decomposição do H_2O_2 transformando-o em água e O_2 . A atividade da CAT pode ser monitorada diretamente pela diminuição do H_2O_2 no meio a um $\lambda = 240\text{nm}$ no espectrofotômetro. Para a reação que determina a atividade da catalase são necessários os seguintes reagentes: H_2O_2 20mM, Triton X-100 0,1%, solução tampão fosfato de potássio 10mM pH 7,0 e 10 μ l de sobrenadante. Uma unidade de CAT é definida como 1 μ mol de peróxido de hidrogênio consumido por minuto, sendo a atividade específica expressa como unidades de CAT por mg de proteínas (Aebi 1984).

Técnicas Enzimas do Metabolismo energético

Creatinaquinase (CK)

A reação continha reagentes nas seguintes concentrações finais: tampão Tris-HCl 65 mM, pH 7.5, fosfocreatina 7.0 mM, $MgSO_4$ 9.0 mM e aproximadamente 1 μ g de proteína no volume final de 0,1 ml. Após 5 min de pré-incubação a 37°C, a reação foi iniciada pela adição de 0,3 μ mol de ADP. A reação é interrompida após 10 min pela adição de 1 μ mol de ácido 4-p-hidroxi-mercuribenzoico. Os tempos de incubação e as concentrações finais foram escolhidos visando assegurar a linearidade

da reação enzimática. Controles apropriados foram realizados para medir a hidrólise química da fosfocreatina e da quantidade de creatina já presente no material enzimático. A creatina formada foi estimada de acordo com o método colorimétrico de Hughes (1962). A reação de cor é desenvolvida pela adição de 0,1 ml de α -naphthol 2% e 0.1 ml de diacetil 0,05% no volume final de 1ml e após incubar 20 min a 37°C, a leitura é realizada a 540nm. Nenhuma das substâncias adicionadas no meio do ensaio interferiu no desenvolvimento da reação de cor ou nas leituras espectrofotométricas. Os resultados foram expressos em μ mol de creatina formada por min por mg de proteínas.

Piruvatoquinase (PK)

A atividade da PK foi determinada conforme descrito por Leong et al. (1981). O meio de incubação consiste de Tris/HCl 0,1M pH 7.5, MgCl₂ 10 mM, NADH 0,16 mM, KCl 75 mM, ADP 5.0 mM, 7 unidades de L-lactato desidrogenase (LDH), 0.1% (v/v). Triton X-100 e 10 μ l de mitocôndria livre no sobrenadante em volume final a 0,5ml. Após 30 min de pré-incubação a reação iniciou com a adição de PEP 1.0 mM. A oxidação de NADH foi registrada espectrofotometricamente durante 2 min a 340 nm. Os resultados foram expressos em μ mol de piruvato por min por mg de proteínas.

Adenilatoquinase (AK)

A atividade da AK foi medida através de um ensaio enzimático acoplado as enzimas hexoquinase (HK) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) de acordo com Oliver (1955) e com as modificações introduzidas por Dzeja et al. (1999). Para ocorrer, a reação deve conter KCl 100mM, tampão HEPES 20mM, glicose 20 mM, MgCl₂ 4mM, NADP⁺ 2mM, EDTA 1 mM, 4.5 U/ml de HK, 2 U/ml de G6PD e 1 μ g de homogeneizado de proteína. A reação foi iniciada pela adição de ADP 2 mM e em seguida a redução de NADP⁺ foi lida a 340 nm por 3 min no espectrofotômetro. ADP, NADP⁺, G6PD e HK foram dissolvidas em água. As concentrações dos reagentes e o tempo de ensaio (3min) foram escolhidos para garantir a linearidade da reação. Os resultados foram expressos em μ mol de ATP formado por min por mg de proteínas.

Determinação de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada segundo o método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando albumina bovina sérica como padrão.

Resultados

Neste estudo foi investigado se a administração de L-serina alterou algum parâmetro de estresse oxidativo e do metabolismo energético no córtex cerebral de ratos Wistar jovens. Nos ensaios realizados para verificar os parâmetros de estresse oxidativo foram observados os seguintes resultados (Tabela 1): um aumento nos níveis de TBARS [t(8) = 3.0; p < 0.05], assim como para o conteúdo de sulfidrilas que teve um aumento significativo [t(8) = 3.5; p < 0.01]; a presença de espécies reativas foi avaliada pela formação de DCF que se mostrou aumentada [t(8) = 2.7; p < 0.05]; a atividade da SOD aumentou [t(8) = 2.5; p < 0.05] assim como a atividade da CAT [t(8) = 2.5; p < 0.05], e os níveis de GSH [t(8) = 3.5; p < 0.01]. Nos ensaios realizados para mensurar a atividade das enzimas do metabolismo energético foram obtidos os seguintes resultados (Tabela 2): aumento significativo da atividade das enzimas CK citosólica [t(8) = 2.9; p < 0.05], CK mitocondrial [t(8) = 4.6; p < 0.01] e AK [t(8) = 3.7; p < 0.01]; a atividade da PK não teve alterações significantes [t(8) = 2.1; p > 0.05].

Discussão

A desordem na biossíntese de L-serina é um erro inato do metabolismo, caracterizado pela deficiência da enzima PGDH que promove uma diminuição nos níveis de L-serina, podendo também afetar os seus metabólitos, como a glicina e a D-serina, além de afetar outros importantes processos bioquímicos, como a biossíntese de proteínas, fosfolípidos, esfingomielina, cerebrosídeos, cisteína, purinas, metil tetrahidrofolato (MTHF) e timidina (Jaeken et al. 1996; Häusler et al. 2001). A participação da serina em tais processos explica os graves sintomas clínicos associados à deficiência de PGDH em indivíduos afetados, como microcefalia congênita e progressiva, atrofia cerebral com hipomielinização, convulsões e retardo no desenvolvimento neuromotor (Häusler et al. 2001).

Estudos anteriores já observaram que com a utilização de altas doses de serina como tratamento há um alívio dos sintomas neurológicos relatados, como por

exemplo, redução na frequência das convulsões, entretanto, junto com as melhorias obtidas foram percebidos efeitos adversos referentes à administração de altas doses de serina, tais como vômitos, desenvolvimento de nistagmo, mioclonia e redução do crescimento craniano (Koning 2006; Jaeken et al. 1996). O retardo no crescimento craniano pode estar associado à redução do transporte de outros aminoácidos para o sistema nervoso central, devido à inibição competitiva em transportadores comuns de aminoácidos, causada por doses excessivas de serina. Portanto, são necessários certos cuidados no tratamento com serina na deficiência de PGDH devido aos efeitos adversos relatados na literatura (Häusler et al. 2001).

Considerando o escasso conhecimento sobre os efeitos de uma administração de doses elevadas de serina e que houve um aumento progressivo no consumo de aminoácidos individuais nos últimos anos, tanto para fins terapêuticos quanto para fins de suplementação alimentar (Kaneko et al. 2009), nosso estudo teve por objetivo avaliar os efeitos da administração de doses elevadas de L-serina sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo energético, a fim de observar as consequências de doses elevadas de tal aminoácido.

Alguns estudos já demonstraram que altas concentrações de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina podem causar danos em tecidos, especialmente no tecido nervoso (Moraes et al. 2010; Sgavaratti 2008; Rojas et al. 2012). Esses danos podem ser atribuídos à produção abundante de ERO no cérebro devido ao grande consumo de oxigênio pelos neurônios. Em situações normais essa produção é balanceada pelos sistemas de defesas antioxidantes celulares, entretanto, quando ocorre um desequilíbrio nesse balanço que favoreça as ER haverá como consequência danos celulares que atingem lipídeos, proteínas e DNA (Sies 1997). Conforme Artuch et al. (2004), o estresse oxidativo, causado pelo aumento da produção de ER e/ou redução das defesas antioxidantes, pode estar envolvido numa variedade de fisiopatologias de vários erros inatos do metabolismo e doenças neurodegenerativas, visto que algumas dessas patologias apresentam altos níveis de ER.

A investigação de mecanismos fisiopatológicos de doenças especialmente do metabolismo cerebral é realizada através de modelos animais, ajudando a sugerir novas medidas de prevenção e novas drogas para o tratamento. No entanto, sabe-se que modelos animais não reproduzem perfeitamente as doenças humanas em toda

sua complexidade, contudo, podem estudar isoladamente cada substância que tende a se acumular em doenças humanas (Skvorak 2009; Moraes et al. 2010). Em nosso estudo não houve a ausência ou deficiência da enzima PGDH, contudo as doses de L-serina administradas foram semelhantes às doses terapêuticas utilizadas em pacientes que apresentam esta desordem metabólica, a fim de testar os efeitos de altas concentrações de serina. Entretanto, altas concentrações de serina inibem a enzima PSPH por feedback negativo (Marks et al. 2007), sendo então possível sugerir que não houve produção normal deste aminoácido durante a administração de serina, permanecendo apenas o aminoácido suplementado, aproximando nosso estudo da deficiência de PGDH.

Inicialmente, observamos que administração de serina foi capaz de aumentar significativamente a oxidação de DCFH, sugerindo níveis elevados de ER nas amostras testadas. Conforme estudos anteriores de nosso laboratório, esse mesmo parâmetro de estresse oxidativo também foi alterado em experimentos que utilizaram outros aminoácidos, como histidina, fenilalanina, triptofano e, da mesma forma que serina, todos tiveram a capacidade de aumentar os níveis de ER (Rojas et al. 2012; Moraes et al. 2010; Feksa et al. 2008).

Em seguida, determinamos a atividade das enzimas antioxidante SOD e CAT, onde a serina foi capaz de alterar significativamente a atividade de ambas as enzimas. O aumento na atividade da SOD ocorre por elevados níveis de $O_2^{\bullet-}$, pois a enzima é capaz de dismutar o $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 . Esse H_2O_2 pode então estar envolvido na alteração da atividade da CAT, uma vez que a CAT possui a capacidade de transformar H_2O_2 em água. Outra relevante observação é que a serina foi capaz de elevar os níveis de lipoperoxidação nas amostras testadas. Embora altos níveis de H_2O_2 já estejam envolvidos no aumento da atividade da CAT, podem também ser utilizados em duas outras reações, a reação de Fenton, onde H_2O_2 reage com Fe^{2+} formando Fe^{3+} e OH^{\bullet} , e a reação de Haber-Weiss, em que o H_2O_2 mais o O^{2-} também produzem OH^{\bullet} . Então, considerando que este OH^{\bullet} tem baixa capacidade de difusão e das ERO é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares (Anderson 1996), é possível que OH^{\bullet} formado por elevados níveis de H_2O_2 seja o responsável pelo aumento da peroxidação lipídica encontrada nas amostras. Na sequência, os níveis totais de sulfidrilas aumentaram. Considerando que um terço do total do grupo sulfidrilas é compreendido pela GSH (Aksenov e Markesbery 2001), é possível que

ao menos uma parte do aumento de tióis observados em nossas amostras seja reflexo do aumento da síntese de GSH, uma vez que a presença de estresse oxidativo, como já foi abordado em outros estudos, é o principal estímulo para sua síntese (Jones 2006; Requejo et al. 2010; Lu 2000). Sendo assim, nossos resultados sugerem que doses elevadas de serina podem induzir tanto dano a lipídeos quanto dano a proteínas.

Em relação ao sistema de defesa antioxidante não-enzimático, a serina aumentou marcadamente o conteúdo de GSH nas amostras testadas. A GSH é uma das principais formas de proteção não enzimáticas contra o dano oxidativo, encontrada em todos os tecidos, especialmente no córtex cerebral. Duas moléculas de GSH juntamente com glutathione peroxidase (GPx) reduzem H_2O_2 (Marks et al. 2007). Portanto, tendo em vista que o estresse oxidativo é um modulador da transcrição do gene da GSH (Lu 2000), é possível que o aumento de GSH observado em nossos resultados deva-se aos níveis elevados de H_2O_2 .

Com diversos parâmetros de estresse oxidativo alterados e supondo que eles estejam associados a doses elevadas de serina, semelhantes à utilizada para fins terapêuticos, achamos cabível pesquisar se houve alteração em alguns parâmetros enzimáticos do metabolismo energético. Para isso investigamos a atividade das enzimas CK, PK e AK que fazem parte da rede de transferência de fosfato, mecanismo fundamental que visa manter a demanda energética das células (Dzeja et al. 1999).

PK é uma enzima da via glicolítica que catalisa a transferência irreversível de um grupo fosforil do fosfoenol piruvato (PEP) para ADP utilizando K^+ e Mg^{2+} ou Mn^{2+} (Nelson et al. 2011). Embora estudos anteriores tenham observado que a atividade da PK diminui após a exposição a agentes que promovem a formação de radicais livres (Holtzman et al. 1998; Dechent et al. 1999), neste estudo não houve alteração da atividade da PK. No entanto, doses elevadas de serina foram capazes de promover um aumento significativo na atividade tanto da AK quanto da CK mitocondrial e citosólica. Ambas as enzimas, AK e CK, estão intimamente relacionadas, de maneira que quando a atividade de uma está diminuída a da outra está aumentada (Dzeja et al. 1996). As enzimas AK e CK catalisam reações reversíveis, enquanto AK realiza a interconversão de ATP, ADP e AMP, a CK realiza a transferência de um grupo fosforil da molécula de ATP para a creatina

assim como pode também transferir um grupo fosforil da fosfocreatina para ADP (Pucar et al. 2000; Furter et al. 1993). A maior parte da energia liberada pela célula é proveniente do processo de fosforilação oxidativa que ocorre nas mitocôndrias, especialmente na cadeia respiratória, sendo este o local onde O_2 é reduzido a H_2O por elétrons doados do NADH e $FADH_2$, que fluem através dos complexos da cadeia respiratória gerando ATP a partir de ADP e P_i (Nelson et al. 2011). Contudo, o estresse oxidativo pode danificar a cadeia respiratória, devido à maior sensibilidade de alguns complexos, principalmente complexo I e succinato desidrogenase, que possuem em suas estruturas grupamentos Fe-S, que são especialmente sensíveis ao $O_2^{\bullet-}$ (Raha e Robinson 2000). Logo, com o transporte de elétrons prejudicado há uma baixa na produção de ATP (Cassarino e Bennet 1999), com isso é possível que o aumento significativo tanto da AK quanto da CK citosólica e mitocondrial observadas nas amostras testadas seja uma resposta à necessidade de manter os níveis de ATP celular, visto que modificações nas concentrações de ATP, ADP e AMP podem alterar enzimas importantes e regulatórias em diversas rotas biossintéticas e oxidativas, entre elas as enzimas da rede de transferência de grupos fosforil, de maneira que estas percebem mudanças no estado metabólico e energético celular (Dzeja et al. 2000). Por outro lado, é possível que o aumento da metabolização da serina aumente a síntese de ATP, estimulando a atividade das enzimas AK, CK citosólica e CK mitocondrial para aumentar a transferência de grupamentos fosforil da mitocôndria para o citosol e sua utilização em processos metabólicos.

Por fim, a L-serina é considerada de fato a principal forma de tratamento da deficiência de PGDH, embora não se tenha muitos relatos de indivíduos com essa desordem metabólica até o presente momento. Entretanto, nossos resultados concluem que doses elevadas de serina alteram parâmetros de estresse oxidativo, assim como de enzimas do metabolismo energético. Com esses dados, sugerimos que mais atenção deva ser dada a crianças que nascem com a deficiência de PGDH e que fazem uso desse tratamento. Portanto, a fim de compreender outros possíveis efeitos causados pela administração excessiva de L-serina no organismo, ainda são necessários mais estudos, já que pouco se conhece e se tem descrito na literatura sobre este aminoácido.

Agradecimentos

Este trabalho recebeu subsídios do Governo Brasileiro através da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul).

Tabela 1. Efeitos da administração de L-serina sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos Wistar jovens.

	Controle	L-Serina
TBA-RS (nmol de TBA-RS/mg proteína)	3,62 ± 0,44	4,37 ± 0,33*
DCF (nmol de DCF formada/mg proteína)	4,44 ± 0,5	5,48 ± 0,70*
Sulfidrina (nmol de TNB/mg proteína)	9,65 ± 0,74	12,70 ± 1,80*
GSH (nmol de GSH/mg proteína)	0,44 ± 0,062	0,56 ± 0,05*
CAT (U CAT/mg proteína)	1,26 ± 0,23	1,80 ± 0,41*
SOD (U SOD/mg proteína)	2,16 ± 0,37	2,70 ± 0,28*

Os dados são médias ± DP para n = 5 animais por grupo. *p<0.05 comparado ao controle (Teste t de Student para amostras independentes).

Tabela 2. Efeitos da administração de L-serina sobre alguns parâmetros de metabolismo energético em córtex cerebral de ratos Wistar jovens.

	Controle	L-Serina
AK (µmol de ATP formado por min/mg de proteína)	0,35 ± 0,04	0,48 ± 0,06*
PK (µmol de piruvato formado por min/mg de proteína)	0,30 ± 0,05	0,29 ± 0,04
CK Mitocondrial (µmol de creatina formada por min/mg de proteína)	0,32 ± 0,07	0,53 ± 0,07*
CK Citosólica (µmol de creatina formada por min/mg de proteína)	1,36 ± 0,10	1,65 ± 0,20*

Os dados são médias ± DP para n = 5 animais por grupo. *p<0.05 comparado ao controle (Teste t de Student para amostras independentes).

Referências Bibliográficas

Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121-126

Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302:141-145

Anderson D (1996) Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat Res* 350(1):103-108

Artuch R, Colomé C, Sierra C, Brandi N, Lambruschini J, Urgate D et al (2004) A longitudinal study of antioxidant status in phenylketonuric patients. *Clin Biochem* 37:198-203

Barreiros ALBS, David JM (2006) Estresse Oxidativo: Relação entre Geração de Espécies Reativas e Defesas do Organismo. *Química Nova* 29(1): 113-123

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

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

Cassarino DS, Bennet Jr JP (1999) An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res* 29:1-25

Dechent P, Pouwels PJ, Wilken B, Hanefeld F, Frahm J (1999) Increase of total creatine in human brain after oral supplementation of creatine-monohydrate. *Am J Physiol.* 277(3 Pt 2):R698-704

Dzeja PP, Zelznikar RJ, Goldberg ND (1996) Suppression of Creatine Kinase-catalyzed Phosphotransfer Results in Increased Phosphoryl Transfer by Adenylate Kinase in Intact Skeletal Muscle. *J Biol Chem* 271(22):12847-51

- Dzeja PP, Vitkevicius KT, Redfield MM, Burnett JC, Terzic A (1999) Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium: increased contribution in heart failure. *Circ Res* 84:1137-1143
- Dzeja PP, Redfield MM, Burnett JC & Terzic A (2000) Failing energetics in failing hearts. *Current cardiology reports* 2:212-217
- Dzeja PP, Bortolon R, Perez-Terzic C, Holmuhamedov EL, Terzic A (2002) Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10156–10161
- Feksa LR, Latini A, Rech V, Feksa PB, Koch GDW, Amaral MFA, Leipnitz G, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wannmacher CD (2008) Tryptophan administration induces oxidative stress in brain cortex of rats. *Metab Brain Dis* DOI 10.1007/s11011-008-9087-4
- Furter R, Furter-Graves EM, Wallimann T (1993) Creatine Kinase: The reactive cysteine is required for synergism but is non-essential for catalysis. *Biochemistry* 32:7022-7029
- Furuya S, Tabata T, Mitoma J, Yamada K, Yamasaki M, Makino A, Yamamoto T, Watanabe M, Kano M, Hirabayashi Y (2000) L-Serine and glycine serve as major astroglia-derived trophic factors for cerebellar Purkinje neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11528–33
- Halliwell B (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18:685–716
- Häusler MG, Jaeken J, Mönch E, Ramaekers VT (2001) Phenotypic Heterogeneity and Adverse Effects of Serine Treatment in 3 - Phosphoglycerate Dehydrogenase Deficiency: Report on Two Siblings. *Neuropediatrics* 32:191-195
- Hirabayashi Y, Furuya S (2008) Roles of L-serine and sphingolipid synthesis in brain development and neuronal survival. *Progress in Lipid Research* 47:188-203
- Hodgkins PS, Schwarcz R (1998) Interference with cellular energy metabolism reduces kynurenic acid formation in rat brain slices: reversal by lactate and pyruvate. *Eur J Neurosci.* 10:1986-1994

- Holtzman D, Togliatti A, Khait I, Jensen F (1998) Creatine increases survival and suppresses seizures in the hypoxic immature rat. *Pediatr Res* 44:410–414
- Hughes BP (1962) A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clinica Chimica Acta* 7:597-603
- Jaeken J, Detheux M, Maldergem V, Foulong M, Carchon H, Schaftingen EV (1996) 3-Phosphoglycerate dehydrogenase deficiency: an inborn error of serine biosynthesis. *Archiv Dis Child* 74:542-545
- Jones DP (2006) Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 9-10:1865-1879
- Kaneko I, Han L, Liu T, Li J, Zhao Y, Li C, Yi Y, Liang A, Hayamizu K (2009) A 13-week subchronic oral toxicity study of L-serine in rats. *Food and Chemical Toxicology* 47:2356–2360
- Koning TJ de, Duran M, Dorland L, Gooskens R, Schaftingen E, Jaeken J, Blau N, Berger R, Poll-The BT (1998) Beneficial effects of L-serine and glycine in the management of seizures in 3-phosphoglycerate dehydrogenase deficiency. *An Neurol* 44:261-265
- Koning TJ de, Fuchs SA, Klomp LWJ (2006) Serine, Glycine e Threonyne. In: Oja SS, Schousboe A (Org). *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology Amino Acids and Peptides in the Nervous System*. 3rd edn. Springer, pp 32-45
- Koning TJ de (2006) Treatment with amino acids in serine deficiency disorders. *J Inher Metab Dis* 29:347-351
- LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5:227–231
- Leong SF, Lai JCK, Lim L, Clark JB (1981) Energy-metabolising enzymes in brain regions of adult and aging rats. *J Neurochem* 37:1548–1556

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–267
- Lu SC (2000) Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 30:42–59
- Marklund SL (1985) Oxygen toxicity and protective systems. *J Toxicol Clin Toxicol* 23:289-298
- Marks AD, Smith C, Lieberman M (2007) *Bioquímica médica básica de Marks: uma abordagem clínica*. 2nd edn. Artmed, Porto Alegre
- Moraes TB, Zanin F, da Rosa A, de Oliveira A, Coelho J, Petrillo F, Wajner M, Dutra-Filho CS (2010) Lipoic acid prevents oxidative stress in vitro and in vivo by an acute hyperphenylalaninemia chemically-induced in rat brain. *J Neurol Sci* 292:89–95
- Nelson DL, Cox MM (2011) *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 5rd edn. Artmed. Porto Alegre
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358
- Oliver IT (1955) A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase. *Biochem J*. 61:116-122
- Pucar D, Janssen E, Dzeja PP, Juranic N, Macura S, Wieringa B, Terzic A,(2000) Compromised Energetics in the Adenylate Kinase AK1 Gene Knockout Heart under Metabolic Stress. *J. Biol. Chem* 275:41424-41429
- Raha S, Robinson BH (2000) Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *TIBS* 25:502-8
- Requejo R, Hurd TR, Costa NJ, Murphy MP (2010) Cysteine residues exposed on protein surfaces are the dominant intrami-tochondrial thiol and may protect against oxidative damage. *FEBS J* 277:1465–1480
- Rojas D, Gemelli T, de Andrade R, Campos A, Dutra-Filho S, Wannmacher CD (2012) Administration of Histidine to Female Rats Induces Changes in Oxidative Status

in Cortex and Hippocampus of the Offspring. *Neurochem Res*. DOI: 10.1007/s11064-012-0703-7

Sies H (1997) Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. *Experimental Physiology* 82:291-295

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

Sgavaratti AM (2008) Tyrosine promotes oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *Int J Dev Neurosci* 26:551-559

Shimizu M, Furuya S, Shinoda Y, Mitoma J, Okamura T, Miyoshi I. (2004) Functional analysis of mouse 3-phosphoglycerate dehydrogenase (Phgdh) gene promoter in developing brain. *J. Neurosci Res* 76:623-32

Sugishita H, Kuwabara Y, Toku K, Doi L, Yang L, Mitoma J, et al. (2001) L -Serine regulates the activities of microglial cells that express very low level of 3-phosphoglycerate dehydrogenase, an enzyme for L-Serine biosynthesis. *J Neurosci Res* 64:392–401

Tabatabaie L, Klomp LW, Berger R, Koning TJ de (2010) L-serine synthesis in the central nervous system: A review on serine deficiency disorders. *J Genetics Metab* 99:256-262

Yamasaki M, Yamada K, Furuya S, Mitoma J, Hirabayashi Y, Watanabe M (2001) 3-Phosphoglycerate dehydrogenase, a key enzyme for L -serine biosynthesis, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage and olfactory ensheathing glia in the mouse brain. *J Neurosci* 21:7691-704

Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77:325-332

III – CONCLUSÃO

- 1) No córtex cerebral de ratos Wistar jovens a administração de altas doses de serina alterou alguns parâmetros de estresse oxidativo, havendo um aumento significativo:
 - a. Na oxidação do DCFH;
 - b. Nas TBA-RS e Sulfidrilas;
 - c. Nos níveis de GSH;
 - d. Na atividade da SOD e CAT.

- 2) Também no córtex cerebral de ratos Wistar jovens a administração de altas doses de serina alterou alguns parâmetros de metabolismo energético:
 - a. Aumentou significativamente a atividade da AK, CK mitocondrial e CK citosólica;
 - b. Não alterou a atividade da PK.

Como conclusão final, os resultados obtidos em nosso trabalho sugerem que o estresse oxidativo e a alteração nas enzimas do metabolismo energético estejam vinculados aos efeitos adversos causados pela administração de doses elevada de serina. Estes resultados sugerem que os pacientes tratados com altas dosagens de serina devem ser acompanhados quanto a possíveis efeitos colaterais, visto que pouco se sabe sobre os efeitos que a serina possa vir a causar no organismo.

IV – PERSPECTIVAS

Como perspectiva inicial da continuação deste trabalho, destaca-se:

- 1) Investigação do efeito da administração crônica de altas doses de L-serina sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo energético no córtex cerebral, cerebelo e hipocampo de ratos wistar jovens.
- 2) Investigar as atividades dos complexos da cadeia respiratória do córtex cerebral de ratos jovens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS

Behl C, Moosmann B (2002) Antioxidant neuroprotection in alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radic Biol Med* 33:182-191

Cheng X, Friesen RHE, Lees JC (1996) Effects of Conserved Residues on the Regulation of Rabbit Muscle Pyruvate Kinase. *The J of Biol Chem* 271(11):6313-6321

Consler TG, Jennewein MJ, Cai GZ, Lee JC (1992) Energetics of allosteric regulation in muscle pyruvate kinase. *Biochemistry* 31:7870-7878

Figueiredo VC (2008) Efeito da cistina sobre a atividade da adenilatoquinase em córtex cerebral de ratos. Dissertação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Friesen RHE (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

Hall ER, Cottam GL (1978) Isoenzymes of pyruvate kinase in vertebrates: their physical, chemical, kinetic and immunological properties. *Int J Biochem* 9:785-793

Halliwell B (2000) Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *Nutrition Reviews* 75:1082-1087

Halliwell B, Gutteridge W (2007) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press. New York

Heyduk E, Heyduk T, Lee JC (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

Koning TJ de, Klomp LWJ (2004) Serine-deficiency syndromes. *Cur Opin Neurol*. DOI: 10.1097/01.wco.0000124712.26506.b1.

Noma T (2005) Dynamics of nucleotide metabolism as a supporter of life phenomena. *J. Med Invest* 52:127-136

Reznick AZ, Packer L (1993) Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. In Poli G., Albano E., Dianzani M.U. (editors) Free radicals: from basic Science to Medicine: Basel, BirkhäuserVerlag, 425-437

Silva CG, Bueno AR, Schuck PF, Leipnitz G, Ribeiro CA, Wannmacher CD, Wyse AS, Wajner M (2003) D-2-Hydroxyglutaric acid inhibits creatine kinase activity from cardiac and skeletal muscle of young rats. *Eur J Clin Invest* 33:840-847

Wajner M, Latini A, Wyse ATS, Dutra-Filho S (2004) The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: Insights from animal studies. *J Inherit Metab Dis* 27:427-448

Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K & Eppenberger HM (1992) Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the phosphocreatine circuit for cellular energy homeostasis. *Bioch J* 281:21-40