

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Avaliação do efeito preventivo da suplementação de creatina, piruvato e taurina sobre parâmetros de estresse oxidativo e de metabolismo energético induzidos pela administração prolongada de leucina a ratos Wistar

**Elenara Rieger**

Orientador: Prof. Dr. Clovis Milton Duval Wannmacher

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre, 2017

#### CIP - Catalogação na Publicação

Rieger, Elenara

Avaliação do efeito preventivo da suplementação de creatina, piruvato e taurina sobre parâmetros de estresse oxidativo e de metabolismo energético induzidos pela administração prolongada de leucina a ratos Wistar / Elenara Rieger. -- 2017.

102 f.

Orientador: Clovis Milton Duval Wannmacher.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. estresse oxidativo. 2. rede de fosforiltransferência. 3. hiperleucinemias. 4. antioxidantes. 5. Doença da Urina do Xarope do Bordo.

I. Wannmacher, Clovis Milton Duval, orient. II.

Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedico este trabalho aos meus filhos,  
Henri e Ellen.

“A mente que se abre a uma nova ideia  
jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Clovis pelo ensinamento, paciência e compreensão em todos esses anos de convivência;

Aos amigos e colegas de laboratório: Denise, Vanessa, Tanise, Rodrigo, Elissa, Thales, Vivian. Um agradecimento especial à Itiane, sempre muito prestativa, estando ao meu lado durante todo o trabalho, inclusive nos momentos mais difíceis;

À minha família e ao meu esposo, pelo apoio e incentivo;

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado;

Ao Departamento de Bioquímica e à UFRGS, pela excelência no ensino.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
<b>Parte I</b> .....	09
I. INTRODUÇÃO.....	10
I.1 Erros Inatos do Metabolismo.....	10
I.1.2 Doença da Urina do Xarope do Bordo .....	10
I.1.2.1 Diagnóstico.....	13
I.1.2.2 Classificação fenotípica.....	13
I.1.2.2.1 Clássico.....	13
I.1.2.2.2 Intermediário.....	14
I.1.2.2.3 Intermitente.....	14
I.1.2.2.4 Tiamina-responsivo.....	14
I.1.2.2.5 Deficiente em lipoamina desidrogenase (E3).....	15
I.1.2.3 Tratamento.....	15
I.1.2.4 Neuropatologia.....	16
I.1.2.5 Fisiopatologia do dano neurológico.....	17
I.1.3 Metabolismo energético.....	18
I.1.3.1 Rede de fosforiltransferência.....	18
I.1.3.1.1 Creatina cinase.....	20
I.1.3.1.2 Piruvato cinase.....	22
I.1.3.1.3 Adenilato cinase.....	23
I.1.3.1.4 Hexocinase.....	24
I.1.3.1.5 Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.....	25
I.1.4 Radicais livres.....	25
I.1.4.1 Estresse oxidativo.....	27
I.1.5 Defesas antioxidantes.....	28
I.1.5.1 Creatina.....	29
I.1.5.2 Piruvato.....	30
I.1.5.3 Taurina.....	31
I.2 – OBJETIVOS.....	33
I.2.1 Objetivo geral.....	33
I.2.2 Objetivos específicos.....	33
<b>Parte II</b> .....	34
II. CAPÍTULO 1 – Artigo 1.....	35
II. CAPÍTULO 2 – Artigo 2.....	58
<b>Parte III</b> .....	82
III.1. DISCUSSÃO.....	83
III.2. CONCLUSÕES.....	91
III.3. PERSPECTIVAS.....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS

AACR – aminoácidos de cadeia ramificada  
ADP - difosfato de adenosina  
AK - adenilato cinase  
AMP – monofosfato de adenosina  
ATP - trifosfato de adenosina  
CACR -  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada  
CAT - catalase  
CK - creatina cinase  
CK Cit – creatina cinase citosólica  
CK Mit – creatina cinase mitocondrial  
CK-BB – creatina cinase citosólica isoforma cerebral  
CK-MB – creatina cinase citosólica heterodímero cardíaca  
CK-Mis – creatina cinase mitocondrial forma sarcomérica  
CK-Miu – creatina cinase mitocondrial forma ubíqua  
CK-MM – creatina cinase citosólica isoforma muscular  
Cr - creatina  
CuZnSOD - cobre-zinco superóxido dismutase  
DXB - doença da urina do xarope do bordo  
E3 – lipoamina desidrogenase  
EIM - erros inatos do metabolismo  
ER – espécies reativas  
ERON - espécies reativas de oxigênio e nitrogênio  
FAD - flavina adenina dinucleotídeo  
FBP – frutose 1,6 bifosfato  
GAPDH- gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase  
GPx - glutatona peroxidase  
GSH – glutatona reduzida  
GSSH – glutatona oxidada  
GTP – trifosfato de guanosina  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio  
HK – hexocinase

HOCl – ácido hipocloroso  
MnSOD - manganês superóxido dismutase  
NAD<sup>+</sup> - nicotiamina adenina dinucleotídeo  
NMDA – N-metil-D-aspartato  
O<sub>2</sub><sup>·-</sup> - radical ânion superóxido  
OH• - radical hidroxil  
OONO<sup>-</sup> - peroxinitrito  
PCr – fosfocreatina  
PEP – fosfoenolpiruvato  
Pi – fosfato inorgânico  
PK – piruvato cinase  
SLC6A8 – transportador de creatina  
SNC - sistema nervoso central  
TCA – ciclo do ácido tricarboxílico  
TnCl – taurina cloroamina

## RESUMO

A doença do xarope do bordo é causada pela deficiência na atividade do complexo desidrogenase dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada, levando ao acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina e de seus  $\alpha$ -cetoácidos correspondentes nos tecidos e fluidos corporais. Os pacientes podem apresentar atraso no desenvolvimento psicomotor e retardo mental. A patofisiologia da doença não é bem compreendida, contudo, o acúmulo do metabólito tóxico leucina induz alterações metabólicas associadas aos sintomas clínicos. Além disso, a capacidade antioxidante está reduzida nestes pacientes. Creatina, piruvato e taurina são potentes antioxidantes em sistemas biológicos e protegem a célula contra os danos causados pelo estresse oxidativo. Portanto, neste estudo, investigamos os efeitos da administração de leucina e da coadministração de creatina mais piruvato e de taurina em alguns parâmetros da rede de fosforiltransferência e de estresse oxidativo em córtex e hipocampo de ratos. A administração de leucina induziu estresse oxidativo com o aumento de radicais livres, e diminuiu a atividade das enzimas piruvato cinase, adenilato cinase, hexocinase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, creatina cinase citosólica e creatina cinase mitocondrial. A coadministração de creatina mais piruvato e de taurina foi capaz de prevenir as alterações causadas pela administração de leucina sobre o estresse oxidativo e as enzimas tiólicas da rede de fosforiltransferência. As correlações significativas entre alguns parâmetros de estresse oxidativo e as enzimas da rede de fosforiltransferência sugerem que a diminuição na atividade das enzimas ocorre devido ao aumento das espécies reativas. Portanto, é possível sugerir que os efeitos nocivos que a leucina causa no cérebro possa contribuir para a disfunção neurológica observada em pacientes com a doença do xarope do bordo, e é possível que a suplementação com creatina, piruvato e taurina possa ser benéfica a estes pacientes.



## ABSTRACT

Maple Syrup Urine Disease is caused by the deficiency of branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex activity leading to accumulation of the branched-chain amino acids leucine, isoleucine and valine and their corresponding branched-chain  $\alpha$ -keto acids in tissues and body fluids. The affected patients may present psychomotor development delay and mental retardation. The pathophysiology of this disease is not entirely understood. However, the accumulation of toxic metabolite leucine induces profound metabolic alterations and impairment of energy homeostasis associated with clinical symptoms. Moreover, the antioxidant capacity is decreased in these patients. Creatine, pyruvate, and taurine plays a critical role in brain function and are potent antioxidants in biological systems, contributing to cellular protection against oxidative stress. In this study, we investigated the effects of leucine administration and coadministration of creatine plus pyruvate and taurine on some parameters of phosphoryl transfer network and oxidative stress in cerebral cortex and hippocampus of rats. Leucine-induced oxidative stress and diminished the activities of pyruvate kinase, adenylate kinase, hexokinase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic creatine kinase, and mitochondrial creatine kinase. Coadministration of creatine plus pyruvate and taurine prevented the alterations provoked by leucine administration on the oxidative stress and the thiol-containing enzymes of phosphoryl transfer network. Significant correlations between some parameters of oxidative stress and the enzymes of the phosphoryl transfer network suggest that the diminution of the enzymes activities is possible due to increase in free radicals. It is possible that these effects of leucine may contribute to the neurological dysfunction observed in patients affected by Maple Syrup Urine Disease. In this case, it is possible that creatine plus pyruvate and taurine supplementation could benefit to the patients.

## **PARTE I**

### **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

## **I. INTRODUÇÃO**

### **I.1 Erros Inatos do Metabolismo**

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são distúrbios genéticos ocasionados por uma deficiência na atividade de uma enzima. A diminuição na atividade enzimática leva a um bloqueio total ou parcial de uma rota metabólica que tem como consequência o acúmulo do substrato e a ausência do produto final. Os indivíduos afetados apresentam sintomatologia variada e a gravidade da doença depende da rota metabólica afetada, bem como do metabólito acumulado ou deficiente. Geralmente são doenças graves que na maioria das vezes afetam o Sistema Nervoso Central e que podem levar o paciente à óbito quando não tratado precocemente (Scriver et al., 2001).

#### **I.1.2 Doença da Urina do Xarope do Bordo**

A Doença da Urina do Xarope do Bordo (DXB) foi descrita inicialmente em 1954, por Menkes e colaboradores, que identificaram quatro casos de uma doença degenerativa cerebral em uma mesma família, caracterizada por edema cerebral, convulsões, espasticidade e sofrimento respiratório. A manifestação do quadro clínico ocorreu na primeira semana de vida e o prognóstico fatal em três meses. O achado mais proeminente foi encontrado na urina que tinha um forte odor de xarope do bordo, cheiro parecido ao de açúcar queimado, e esta síndrome foi chamada de Doença da Urina do Xarope do Bordo. Em 1959, Dancis e colaboradores identificaram que os compostos acumulados na doença eram os aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e seus  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada (CACR). E, em 1960, o mesmo grupo de pesquisa identificou através de estudos enzimáticos em leucócitos e fibroblastos que a doença é causada pela deficiência na atividade do complexo desidrogenase dos  $\alpha$ -cetoácidos de

cadeia ramificada. O primeiro tratamento foi proposto em 1964 por Snyderman e colaboradores, que sugeriram uma dieta restrita em aminoácidos de cadeia ramificada.

Portanto, a DXB é um Erro Inato do Metabolismo causado por uma deficiência na atividade do complexo da desidrogenase dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada como ilustrado na Figura 1. A incapacidade deste complexo enzimático em descarboxilar os  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada,  $\alpha$ -cetoisocapróico,  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvalérico e  $\alpha$ -cetoisovalérico leva ao acúmulo tecidual desses metabólitos e de seus aminoácidos precursores de cadeia ramificada, leucina, isoleucina e valina (Chuang e Shih, 2001).

A DXB é uma doença metabólica de caráter autossômico recessivo cuja frequência mundial é de aproximadamente 1 para cada 185.000 nascidos vivos (Chuang e Shih, 2001). Em comunidades menonitas dos Estados Unidos, a incidência estimada é de 1:200 nascidos vivos (Morton et al., 2002). No Brasil, a frequência da DXB pode ser maior do que a literatura internacional comenta, pois em um levantamento realizado em recém-nascidos brasileiros, foi estimada uma frequência aproximada de 1:84.000, (Jardim et al., 1995).

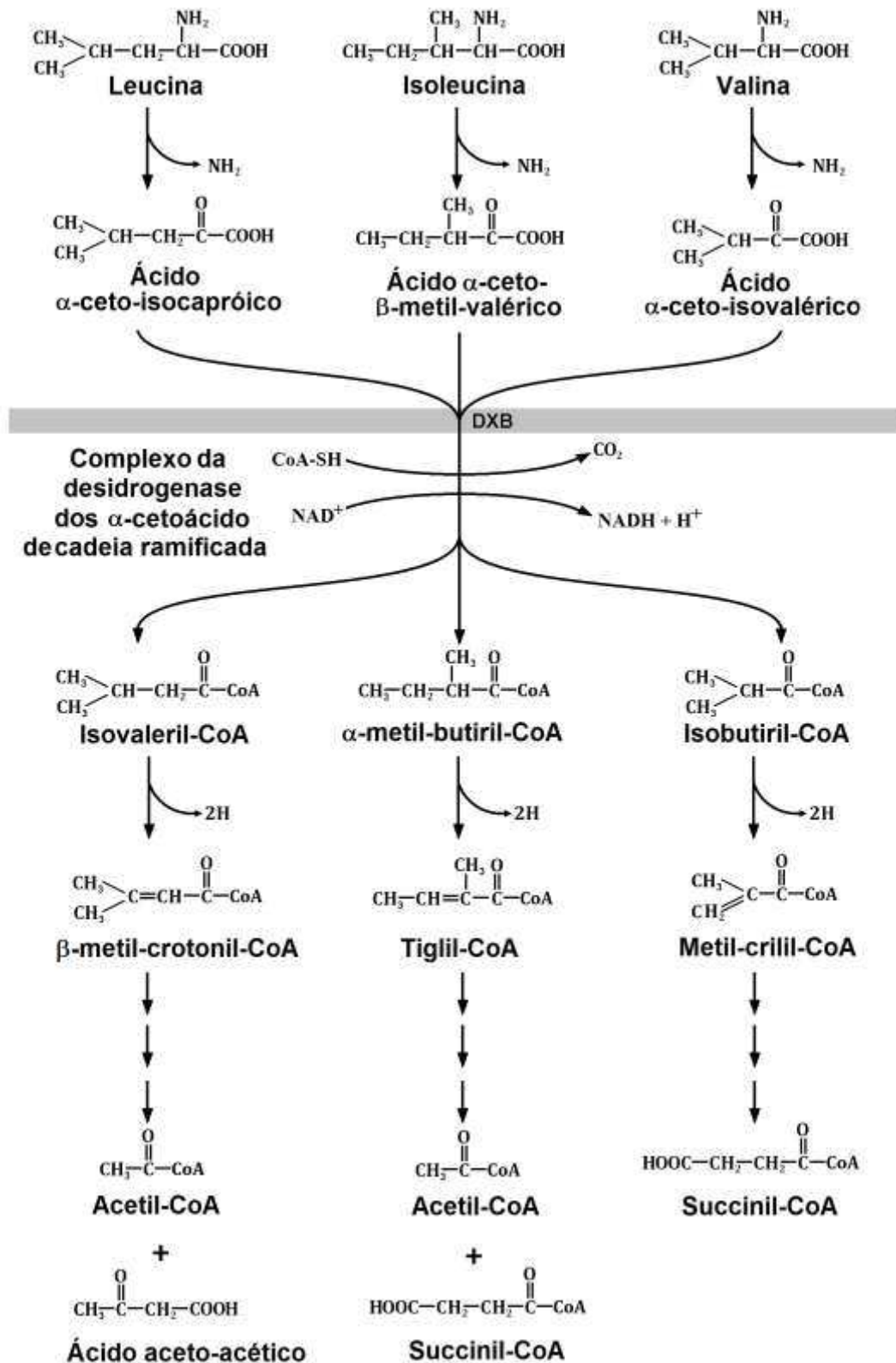


Figura 1. Rota metabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina, indicando o bloqueio metabólico que ocorre na doença da urina do xarope do bordo (Adaptado de Scriver et al., 2001).

### **I.1.2.1 Diagnóstico**

O diagnóstico da doença é feito através da identificação de altas concentrações dos AACR no sangue e seus derivados na urina através de cromatografia de aminoácidos e de ácidos orgânicos, respectivamente (Chuang e Shih, 2001). O método de espectrometria de massa em Tandem permite a identificação precoce da DXB quando os pacientes ainda são assintomáticos ou apresentam poucos sintomas (Peinemman e Danner, 1994; Simon et al., 2006). A leucina, principal metabólito acumulado, pode atingir concentrações séricas de 5 mM, e isoleucina e valina chegam a concentrações de 1mM (Bremer et al., 1981). A confirmação do diagnóstico se dá pela medida da atividade do complexo enzimático  $\alpha$ -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada em cultura de leucócitos periféricos de pacientes (Peinemman e Danner, 1994; Chuang e shih, 2001).

### **I.1.2.2 Classificação fenotípica**

A DXB apresenta cinco fenótipos clínicos que variam conforme a apresentação clínica, a atividade residual da enzima e na resposta à administração de tiamina. Estes são: clássico, intermediário, intermitente, tiamina-responsivo e deficiente em lipoamina desidrogenase (E3) (Chuang e Shih, 2001).

#### **I.1.2.2.1 Clássico**

A forma clássica da DXB corresponde a 80% dos casos e representa o fenótipo mais grave e comum da doença. Os níveis de leucina e seu  $\alpha$ -cetoácido chegam a concentração de 5 mM no sangue. A atividade residual do complexo enzimático é menor que 2%. Os primeiros sinais clínicos da doença se manifestam entre o 4º e o 7º dia de vida, e incluem cetoacidose, hipoglicemia, dificuldade de alimentação, apnéia, ataxia, convulsões, coma, letargia, deterioração neurológica, odor de açúcar queimado

na urina. A maioria dos pacientes, quando não tratados, morre nos primeiros meses de vida em decorrência de crises metabólicas decorrentes e pela deterioração neurológica, precipitada por eventos relacionados ao catabolismo, como infecções, cirurgias ou vacinas (Chuang e Shih, 2001).

#### **I.1.2.2.2 Intermediário**

A forma intermediária apresenta elevações persistentes dos AACR, porém, menores do que as verificadas na forma clássica. A atividade residual da enzima varia de 3 a 30%. Este fenótipo não apresenta sintomas severos no período neonatal e em muitos casos não ocorre descompensação metabólica aguda. O diagnóstico é tardio, ocorre entre 5 meses a 7 anos de idade em decorrência do atraso no desenvolvimento acompanhado de cetoacidose e convulsões (Chuang e Shih, 2001).

#### **I.1.2.2.3 Intermitente**

Pacientes apresentam um desenvolvimento normal, com níveis de AACR dentro da faixa de normalidade ou com discretas elevações; no entanto, apresentam risco de sofrerem descompensação metabólica durante situações de estresse. A atividade enzimática residual é de 5 a 20%. Os sintomas surgem entre os 5 meses e os 2 anos de idade em associação com infecções, ocorrem mudanças agudas no comportamento e dificuldade para andar, podendo evoluir para o coma (Chuang e Shih, 2001).

#### **I.1.2.2.4 Tiamina-responsivo**

Neste fenótipo, a atividade residual do complexo é de 2 a 40% e os níveis de AACR (2 – 5 mM) são reduzidos para níveis normais com doses de 10 a 1000 mg/dia de tiamina e com dieta restrita em proteínas. As manifestações clínicas são a descompensação metabólica, cetoacidose e atraso no desenvolvimento psicomotor (Chuang e Shih, 2001).

#### **I.1.2.2.5 Deficiente em lipoamina desidrogenase (E3)**

A deficiência de E3 é a forma mais rara e apresenta sinais clínicos semelhantes aos da forma intermediária, porém, acompanhada de acidose láctica. A atividade residual da enzima é de 0 a 25% e há o aumento de lactato, piruvato,  $\alpha$ -cetogluturato,  $\alpha$ -hidroxiisovalerato e  $\alpha$ -hidroxiglutarato. Ocorre a deficiência das três enzimas em que o E3 é componente, a  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase, piruvato desidrogenase e o complexo desidrogenase dos  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada. O diagnóstico ocorre entre 8 semanas e 2 anos de idade com acidose láctica persistente, acompanhada de deterioração neurológica progressiva característica e hipotonia (Chuang e Shih, 2001).

#### **I.1.2.3 Tratamento**

O tratamento dos pacientes com DXB consiste em uma dieta hipercalórica com restrição na ingestão de proteínas e suplementada com fórmulas específicas contendo aminoácidos essenciais, exceto aqueles acumulados na doença, além de carboidratos, vitaminas e sais minerais (Strauss et al., 2010). Essencialmente o tratamento visa restaurar a homeostase do metabolismo intermediário e evitar a descompensação metabólica através da manutenção da síntese proteica normal e prevenção do catabolismo proteico, da prevenção de desequilíbrios ou deficiências de aminoácidos e intermediários metabólicos, da atenuação da disfunção celular, da restauração da homeostase energética e da promoção do anabolismo. Espera-se assim normalizar as concentrações de AACR e contribuir para o bom desenvolvimento do SNC dos indivíduos afetados, pois quanto maior o tempo que SNC fica exposto a esse aminoácido, maiores serão as sequelas deste paciente. No entanto, o tratamento não impede que haja um grau variável de disfunção neurológica, que é evidenciado pelo atraso no desenvolvimento e pelo retardo mental. Portanto, um diagnóstico e tratamento



precoces, antes dos 15 dias de vida, são cruciais para o desenvolvimento e a sobrevivência destes pacientes, já que os danos neurológicos causados pelo acúmulo dos metabólitos envolvidos na doença são irreversíveis e podem levar à morte nos primeiros meses de vida (Chuang e Shih, 2001; Morton et al., 2002). As necessidades de AACR variam em função da idade, da taxa de crescimento e do déficit enzimático. Para que o paciente tenha um crescimento adequado, a dieta deve ser calculada a partir dos níveis séricos de AACR para que se tenha um aporte calórico e proteico adequado. Além disso, é provável que a restrição dietética a qual se submetem os pacientes cause diminuição nas defesas antioxidantes devido à deficiência de nutrientes essenciais, como vitaminas e sais minerais, e provoque atraso no crescimento e desenvolvimento global, anemia, imunodeficiência, desmielinização e lesões de pele (Morton et al., 2002; Artuch et al., 2004). Para detecção dos pacientes pertencentes ao fenótipo responsivo à tiamina, é administrada tiamina (50-300 mg/dia) nas primeiras três semanas do início do tratamento. A expectativa de vida dos pacientes DXB vem melhorando ao longo dos anos, dados da literatura relatam que um terço dos pacientes diagnosticados tem desenvolvimento psicomotor normal. Destes, a maioria iniciou o tratamento antes dos 10 dias de vida (Serra et al., 2010).

#### **I.1.2.4 Neuropatologia**

Quanto aos achados neuropatológicos da doença observa-se edema generalizado e atrofia dos hemisférios cerebrais, bem como hipomielinização e desmielinização do Sistema Nervoso Central, principalmente durante as crises de descompensação metabólica (Chuang e Shih, 2001; Schönberger et al., 2004). Também ocorrem alterações neurocognitivas, com déficit no raciocínio não-verbal e visual-espacial. Além

disso, os pacientes apresentam alta taxa de distúrbios neuropsiquiátricos, como transtorno de déficit de atenção, depressão e ansiedade (Walsh e Scott, 2010).

Os AACR competem com o sistema L de transporte de aminoácidos na barreira hematoencefálica. Assim, o aumento plasmático de AACR leva ao aumento na entrada destes aminoácidos para o cérebro, diminuindo o transporte de outros aminoácidos como tirosina, triptofano e fenilalanina, e como consequência afeta a biossíntese de neurotransmissores como a serotonina e as catecolaminas. A combinação desses fatores contribui para o dano cerebral na DXB (Strauss et al., 2010; Fernstrom 2005, Huang et al., 1996; Yuwiler e Geller, 1965). Essas deficiências neuroquímicas podem persistir no estado crônico, embora em menor grau, e cumulativamente, contribuir para a morbidade neuropsiquiátrica (Muelly et al., 2013).

#### **I.1.2.5 Fisiopatologia do dano neurológico**

Os mecanismos pelos quais os AACR e seus CACR são tóxicos ao SNC ainda não são totalmente compreendidos. Alguns fatores, tais como a complexidade do desenvolvimento cerebral, as concentrações alcançadas pelas toxinas e o estágio do desenvolvimento do cérebro no momento em que elas atuam prejudicam o esclarecimento desses efeitos. A fisiopatologia da DXB é multifatorial, há o acúmulo de metabólitos com efeitos tóxicos à célula. Dentre os aminoácidos acumulados na doença, a leucina é considerado o mais tóxico; ocorrem efeitos secundários como a deficiência de metabólitos intermediários e micronutrientes; e ocorrem alterações mitocondriais associadas com distúrbio na produção de ATP e estresse oxidativo (Knerr et al., 2012). O acúmulo de leucina causa profundas alterações metabólicas e prejudica a homeostase energética por comprometer a atividade de diversas enzimas, como as enzimas da

cadeia respiratória e do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), o que leva a efeitos deletérios ao metabolismo aeróbico do cérebro (Ribeiro et al., 2008).

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que a administração de leucina compromete o metabolismo energético através da inibição da atividade das enzimas creatina cinase (CK) e piruvato cinase (PK), (Pilla et al., 2003; Feksa et al., 2005), como consequência pode haver a morte de neurônios (Tomimoto et al., 1993), e a depleção celular de antioxidantes importantes como o piruvato (Das, 2006). Esta inibição também está associada ao surgimento de algumas doenças neurodegenerativas (Akzenov et al., 2000). Quanto ao estresse oxidativo, a administração de leucina provocou uma disfunção na atividade mitocondrial (Amaral et al., 2010), aumentou a peroxidação de lipídios e diminuiu as defesas antioxidantes no cérebro de ratos (Bridi et al., 2003 e 2005), além de causar danos à molécula de DNA via produção de radicais livres (Mescka et al., 2014). Estresse oxidativo também foi observado no plasma (Barschak et al., 2008 A e B; Barschak et al., 2006 e 2009, Mescka et al., 2013) e na urina de pacientes com DXB (Guerreiro et al., 2015). Em outro estudo no qual a leucina foi administrada em ratas prenhas e também durante o aleitamento materno, foi observada a presença de estresse oxidativo e alteração dos parâmetros da rede de fosforiltransferência no córtex cerebral e hipocampo da prole (de Franceschi et al., 2013).

### **I.1.3 Metabolismo energético**

#### **I.1.3.1 Rede de fosforiltransferência**

Os mecanismos responsáveis envolvidos no equilíbrio entre o consumo e a produção de ATP são finamente regulados por processos intracelulares. Para um ótimo funcionamento do sistema bioenergético celular, é necessário que compostos ricos em

energia, como o ATP, sejam produzidos e entregues aos locais de consumo em uma velocidade correspondente à sua taxa de consumo (Dzeja et al, 2000, 2003).

Uma rede intracelular enzimática, catalisada principalmente pela creatina cinase (CK), adenilato cinase (AK) e enzimas glicolíticas (especialmente a piruvato cinase – PK), atua em processos de produção e consumo de ATP (Wallimann et al, 1994; Saks et al, 1996; Dzeja et al, 1998). A sinalização metabólica é dinâmica e as enzimas da rede de transferência de grupos fosforil contribuem para a eficiente comunicação energética intracelular na manutenção dos altos níveis de ATP celular (Dzeja et al, 2000; Neumann et al, 2003). A CK é a principal responsável pela produção do ATP (Dzeja et al, 1999). A AK produz 10% do total da renovação de ATP no tecido muscular cardíaco, e 4% no músculo esquelético em repouso. No entanto, a AK pode transferir e utilizar duas moléculas de ADP, podendo assim, em momentos de alta demanda energética fornecer ATP, além de AMP que estimula a via glicolítica por alosteria na enzima fosfofrutocinase (Pucar et al., 2000). Além disso, as enzimas glicolíticas como a hexocinase (HK), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e PK podem contribuir para a transferência intracelular de grupos fosforil (Dzeja et al, 2003). Em média, as concentrações de ATP, ADP e AMP são de 5, 1 e 0,1 mM, respectivamente, e são mantidas em equilíbrio constante dentro da célula (Noma, 2005). Mudanças nessas concentrações podem alterar a atividade de importantes enzimas em diversas rotas oxidativas e de biossíntese (Dzeja et al, 2000). O ATP sozinho não é responsável pelo fluxo de energia na célula. O mecanismo que supre a demanda energética é a rede de fosforiltransferência, da qual fazem parte as enzimas AK, HK, GAPDH, CK e PK (Dzeja et al, 1999).

### **I.1.3.1.1 Creatina cinase**

A CK catalisa a transferência reversível de um grupo N-fosforil da fosfocreatina (PCr) para o ADP, formando ATP e creatina (Cr), conforme a reação que é dependente de magnésio:  $PCr + MgADP \leftrightarrow MgATP + Cr$ . Essa enzima participa na homeostasia de células com necessidades energéticas variáveis e intermitentes como, por exemplo, músculo esquelético e cardíaco, tecidos neurais como cérebro, retina e fotorreceptores e nos eritrócitos (Wallimann, 1992). O pH ótimo para a catálise enzimática varia de 6,0 a 7,0 na direção de formação de ATP e 7,5 a 9,0 na direção de formação de PCr.

Há quatro principais isoenzimas da CK e os nomes são dados em função dos tecidos em que foram historicamente isoladas. Existem duas isoformas citosólicas, a muscular (CK-MM) e a cerebral (CK-BB), ambas existindo como homodímeros sob condições fisiológicas, podendo se apresentar como um heterodímero CK-MB no coração. As isoformas mitocondriais também são duas, a forma ubíqua (CK-Miu) e a sarcomérica (CK-Mis), as quais são expressas predominantemente no cérebro e no músculo estriado, respectivamente (Wallimann et al., 1992). As isoformas da creatina cinase mitocondrial (CK-Mi) geralmente existem como octâmeros, mas podem ser transformadas rapidamente em dímeros (McLeish et al., 2005). As isoformas citosólicas são sempre co-expressadas em tecido específico junto com as isoformas mitocondriais, e essa interação é de fundamental importância para a homeostasia energética celular (Silva et al., 2003).

As isoenzimas da CK são extremamente solúveis, elas são compartimentadas subcelularmente e unidas funcional e/ou estruturalmente com sítios de produção de ATP (glicólise e mitocôndria) ou consumo de energia (ATPases celulares, como ATPase actinmiosina e ATPase retículo sarcoplasmático). Elas formam um sistema de distribuição de energia altamente regulado e intrincado, o circuito da fosfocreatina

(PCr). Diferentes funções têm sido sugeridas para a comunicação entre as isoformas de creatina cinase citosólica e mitocondrial por PCr e Cr (Wallimann, 1994), levando à proposta do modelo de circuito da PCr (Rojo et al., 1991; Wallimann et al., 1992; Wyss et al., 1992). O circuito CK/PCr parece cumprir todas as necessidades de um sistema altamente organizado de transporte e tamponamento de energia, assim como um sistema regulatório para controle das razões subcelulares de ATP/ADP, levando juntos a uma utilização de energia mais eficiente em termos termodinâmicos. Dependendo das necessidades metabólicas da célula ou tecido, uma dessas diferentes funções do circuito CK/PCr pode estar dominante. O circuito PCr serve para melhorar a eficiência termodinâmica da hidrólise do ATP, para manter baixa a concentração de ADP e manter alta a razão ATP/ADP nos sítios subcelulares onde a CK está ligada à processos que consomem ATP, como por exemplo, bombas de íons (Wallimann et al., 1994). O circuito também serve como tampão de energia flutuante, mantendo as concentrações de ATP e ADP estáveis e tamponando os H<sup>+</sup> gerados. Nesse papel, a PCr tem a função de transportadora de energia, conectando sítios de produção de ATP, como fosforilação oxidativa mitocondrial, com sítios de utilização de ATP, onde a CK-Mi tem um papel eminente (Wallimann et al., 1992).

As isoenzimas da CK contêm um grupamento sulfidrílico no sítio ativo: cisteína 278 na CK mitocondrial e cisteína 283 na CK citosólica (Furter, 1993). Modificações que ocorrem nesses grupos tiólicos causadas por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) diminuem a atividade da enzima, sendo assim, esse grupamento tem um importante envolvimento na sua atividade catalítica (Kaneko, 1993; Sukuki et al., 1992). Essa diminuição de atividade produz deficiência energética, acúmulo de ADP e excesso de cálcio intracelular (Wallimann et al., 1994). As ERON elevam os níveis de cálcio intracelular (Ca<sup>2+</sup>) e induzem apoptose (Mattson, 1992). A CK parece estar

envolvida em certas condições patológicas relacionadas com déficit de energia cerebral. Em condições anóxicas, a adição de creatina ao meio de incubação contendo fatias de cérebro de ratos protege a transmissão sináptica e mantém o potencial de ação via  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase (Whittingham, 1981); creatina aumenta os níveis de PCr, reduzindo a queda de ATP, a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  e a morte celular no SNC (Carter et al., 1995). Também foi observado que o processo de mielinização e as demais atividades do sistema nervoso dependem da maturação funcional da CK durante o desenvolvimento do encéfalo do rato com expressão sequencial das isoenzimas (Holtzman et al., 1993).

#### **I.1.3.1.2 Piruvato cinase**

A última etapa da via glicolítica é a transferência do grupo fosforil do fosfoenolpiruvato (PEP) ao ADP, catalisada pela PK, que requer  $\text{K}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$  ou  $\text{Mn}^{2+}$  (Oberfelder et al., 1984). As enzimas glicolíticas estão presentes em todas as células ou tecidos dos mamíferos, a via glicolítica é um sistema fundamental para o metabolismo energético (Heyduk et al., 1992). Entretanto, cada tipo de tecido utiliza essas enzimas de uma maneira específica para seu metabolismo (Friesen et al., 1998). A manutenção do fluxo de energia e de nutrientes para dentro da célula é essencial para a homeostasia e o funcionamento celular.

São conhecidas 4 isoenzimas da PK que são: M1, L, R e M2 (Consler et al., 1989). Essas isoenzimas diferem em suas propriedades químicas, físicas, cinéticas, eletroforéticas e imunológicas, refletindo a sua importância no suprimento das necessidades metabólicas de cada tecido. A isoenzima tipo M<sub>1</sub> é o principal tipo encontrado no músculo esquelético, coração e cérebro adulto (Consler et al., 1988). O tipo L é predominante em tecidos gliconeogênicos, como o fígado e o rim (Oskamet al., 1985). O tipo R está presente nos eritrócitos e tecidos hematopoiéticos. A M<sub>2</sub>-PK é

encontrada no tecido fetal, em células proliferativas e tumorais (Friesen et al., 1998). As expressões dessas isoenzimas são reguladas durante o desenvolvimento. A M<sub>2</sub>-PK é a única detectável precocemente em tecido fetal, sendo gradualmente substituída pelos tipos L, R e M<sub>1</sub>, durante o desenvolvimento. Em contraste, em células transformadas e na regeneração do fígado, as isoenzimas tecido-específicas estão presentes em níveis diminuídos ou completamente ausentes, sendo substituídas pela isoenzima M<sub>2</sub>-PK (Heyduk et al., 1992; Consler et al., 1992). 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 (Valentini et al., 2000).

#### **I.1.3.1.3 Adenilato cinase**

A adenilato cinase (AK) é uma fosfotransferase que catalisa a reação de transferência de fosfatos de alta energia entre os nucleotídeos de adenina, ATP, ADP e AMP, conforme a reação:  $2ADP \leftrightarrow ATP + AMP$ . A AK é responsável pela interconversão de ATP, ADP e AMP (Pucar et al., 2000). Essa enzima potencializa o papel energético do ATP por ter habilidade de regenerar o ATP a partir de dois ADP e também pela regulação dos processos envolvendo os nucleotídeos de adenina, desempenhando assim um importante papel na homeostasia energética celular (Dzeja et al., 1999).

A AK gera sinais metabólicos para a célula, como o AMP, ativando rotas dependentes de AMP (Dzeja et al., 2002). A estrutura da AK sofre grandes mudanças conformacionais durante seu ciclo catalítico. A enzima possui três domínios bem descritos: o CORE, o domínio de ligação do AMP e o domínio de ligação do ATP. Os



dois domínios de ligação do AMP e ATP são descritos como passo limitante da catálise da AK e o CORE é responsável pelas propriedades alostéricas da enzima (Noma et al., 2005; Dzeja et al., 2002).

São descritas até o momento sete isoenzimas da AK (AK1 a AK7), distribuídas em todos os compartimentos intracelulares, espaços intersticiais e líquidos corporais, com a finalidade de regular o metabolismo energético, proporcionando uma eficiente economia energética celular (Dzeja e Terzic, 2009). A AK1 existe no citoplasma e a AK2 está localizada principalmente no espaço intermembrana mitocondrial; ambas utilizam os nucleotídeos de adenina (Dzeja et al., 1999). A AK3 utiliza GTP para formação de ADP ou GDP devido à localização subcelular, pois é encontrada na matriz mitocondrial, onde há a formação de GTP no ciclo do ácido cítrico. A AK4 está localizada na matriz mitocondrial e AK5 no citosol. A AK6 é encontrada no núcleo celular (Noma et al., 2005). A AK7 está relacionada com a motilidade celular, é altamente expressa no epitélio brônquico e parece estar associada com o movimento ciliar (Dzeja e Terzic, 2009).

#### **I.1.3.1.4 Hexocinase**

A hexocinase (HK) está localizada no citosol e catalisa a primeira reação da via glicolítica (Marks et al., 2007). A enzima utiliza o ATP como doador de fosforil ao carbono 6 da glicose, formando a glicose-6-fosfato (Nelson e Cox, 2008). A hexocinase requer magnésio como cofator para exercer sua atividade catalítica, no qual forma um complexo com o ATP (complexo  $MgATP^{2-}$ ). Ela está presente em quase todas as células do organismo, ainda que sob outras formas, como a glicocinase, localizada no hepatócito. Essas isoenzimas são codificadas por genes diferentes, tendo propriedades cinéticas e regulatórias variadas (Nelson e Cox, 2008). A hexocinase cerebral está

associada à membrana mitocondrial externa e o ADP produzido pela enzima controla o potencial de membrana e a geração de espécies reativas. Além disso, a atividade da hexocinase controla a síntese de ATP e a apoptose no cérebro (Da Silva et al., 2004).

#### **I.1.3.1.5 Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase**

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é a primeira enzima que catalisa a fase de pagamento da glicólise (Nelson e Cox, 2008). A GAPDH oxida o gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato, sendo adicionado fosfato inorgânico na molécula em formação, juntamente com a redução do  $\text{NAD}^+$ . O grupo aldeído do gliceraldeído-3-fosfato reage com o grupo sulfidríla de um resíduo essencial da cisteína no sítio ativo da GAPDH. A reação com metal pesado no resíduo de cisteína, tal como o mercúrio, leva à inibição irreversível da enzima (Marks et al., 2007). O aumento na expressão da GAPDH é encontrado em alguns tumores e em células proliferativas e diferenciadas (Perrota et al., 2014).

#### **I.1.4 Radicais livres**

Radicaís livres são qualquer átomo ou molécula que contém um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos. Este não pareamento pode torná-lo altamente instável e reativo, capaz de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita, passando a ter uma função oxidante ou redutora de elétrons (Valko et al., 2007).

Existem diversas fontes geradoras de radicaís livres nos sistemas biológicos. Os radicaís livres podem ser formados endogenamente como subprodutos do metabolismo aeróbico ou por influências externas como uma dieta inadequada, consumo exagerado de álcool, fumo, exposição às radiações ionizante e eletromagnética, poluição atmosférica e etc (Halliwell, 1996).

As espécies reativas (ER) são átomos ou moléculas produzidas constantemente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores de transferência de elétrons em várias reações bioquímicas. Sendo assim, desempenham funções relevantes no metabolismo, como a comunicação intracelular, apoptose, defesa contra agentes infecciosos, dentre outras (Halliwell e Gutteridge, 2007).

As principais fontes das ER são as organelas citoplasmáticas que metabolizam o oxigênio, o nitrogênio e o cloro, gerando grande quantidade de metabólitos (Shami e Moreira, 2004). Em condições fisiológicas, o oxigênio molecular ( $O_2$ ), através do citocromo oxidase mitocondrial, sofre redução e resulta na formação de água (Bergendi et al, 1999) no entanto, aproximadamente 5% deste  $O_2$  não é reduzido a  $H_2O$ , e pode ser convertido em reativos intermediários (Boveris, 1998). Entre as principais formas de espécies reativas de oxigênio estão: ânion superóxido ( $O_2^-$ ), que é decorrente de processos metabólicos ou ativação do oxigênio por irradiação, sendo teoricamente a primeira espécie reativa formada e apresenta baixa capacidade de oxidação quando comparado com outras espécies reativas (Valko et al., 2007); radical hidroxil ( $OH\bullet$ ) que é bastante reativo, uma vez formado age rápido e inespecificamente, podendo atacar e lesar qualquer biomolécula; peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que é fracamente reativo, porém, é capaz de atravessar a membrana nuclear e reagir com outros radicais induzindo danos a moléculas por meio de reações enzimáticas. A sua importância está na capacidade de formar o radical hidroxil através de duas reações: a primeira é a reação de Fenton, onde  $H_2O_2$  reage com  $Fe^{2+}$  formando  $Fe^{3+}$  e  $OH\bullet$  e a segunda é a reação de Haber-Weiss, em que o  $H_2O_2$  mais o  $O_2^-$  também produzem  $OH\bullet$  (Anderson, 1996). Além das espécies reativas de oxigênio, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio, representadas principalmente pelo óxido nítrico ( $NO\bullet$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). O óxido nítrico é pouco reativo e tem grande importância biológica atuando

na vasorregulação e neurotransmissão, porém em excesso pode ser citotóxico. E o peroxinitrito é bastante reativo e pode oxidar lipídios, DNA e aminoácidos (Halliwell, 2001).

As altas concentrações de ERON podem causar danos à estrutura celular, ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas. O  $\text{OH}\cdot$  reage com bases púricas e pirimídicas. Os ácidos graxos poli-insaturados também são muito sensíveis a esse radical, que ataca estes resíduos nos fosfolipídeos (Halliwell, 2000). A cadeia lateral dos aminoácidos de resíduos de proteínas também são os alvos de oxidação, principalmente os resíduos de cisteína e metionina, que são mais suscetíveis à ação das ERON. As oxidações nos resíduos de cisteína formam pontes de dissulfeto reversíveis entre os grupos tiólicos das proteínas, diminuindo as concentrações moleculares de tióis, em particular a glutatona reduzida (GSH), e ainda, ao quebrar essas pontes de dissulfeto, causam a inativação de proteínas (Valko et al., 2007). A concentração de grupos carbonil são bons indicativos da presença de espécies reativas.

#### **I.1.4.1 Estresse oxidativo**

O termo estresse oxidativo se refere a um distúrbio do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante em favor do pró-oxidante, podendo resultar em dano oxidativo a componentes celulares. Em princípio, o estresse oxidativo pode resultar de uma diminuição dos antioxidantes e/ou da produção aumentada de ERON, gerando assim um acúmulo das espécies reativas que causam danos à estrutura das biomoléculas de DNA, lipídios, carboidratos e proteínas. O excesso de espécies reativas no organismo é neutralizado por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. A diminuição dos antioxidantes pode ser causada pela diminuição da atividade das enzimas antioxidantes: cobre-zinco superóxido dismutase (CuZnSOD), manganês

superóxido dismutase (MnSOD), catalase (CAT) ou glutathione peroxidase (GPx) ou pela deficiência nutricional de antioxidantes e/ou outros constituintes dietéticos essenciais: alfa-tocoferol, ácido ascórbico, aminoácidos contendo enxofre necessário para a síntese de glutathione, ou riboflavina necessária para a produção de flavina adenina dinucleotídeo (FAD), um cofator da glutathione redutase (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Todos os tecidos são suscetíveis ao dano oxidativo. No entanto, o cérebro parece ser especialmente sensível a este tipo de lesão, uma razão para isso seria o alto consumo de oxigênio apresentado por este tecido, e a grande quantidade de lipídios poliinsaturados presentes nas membranas neuronais, altamente suscetíveis a lipoperoxidação. Além disso, a auto-oxidação de neurotransmissores como dopamina e noradrenalina também gera espécies reativas e por fim, o tecido cerebral apresenta baixos níveis de defesas antioxidantes (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Evidências sugerem que o estresse oxidativo tem um papel importante na patogênese de muitas doenças neurodegenerativas, como mal de Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica (Reznick e Packer, 1993). Além disso, o estresse oxidativo atua em diversos Erros Inatos do Metabolismo, como nas acidemias orgânicas (Latini et al., 2005; Fontella et al., 2000;) e aminoacidopatias (Streck et al., 2003; Artuch et al., 2001; Bird et al., 1995), dentre outras, sugerindo o seu envolvimento com o dano neurológico observado nessas doenças.

### **I.1.5 Defesas antioxidantes**

O organismo possui mecanismos de defesa contra a ação tóxica das ERON, diminuindo ou eliminando as consequências negativas de seus efeitos no organismo (Marks et al, 2007). Esse sistema de proteção é constituído de defesas enzimáticas e não

enzimáticas. As defesas antioxidantes enzimáticas são as enzimas: catalase, responsável pela decomposição direta do  $H_2O_2$  formando  $H_2O$  e  $O_2$ ; a superóxido dismutase que catalisa a dismutação do radical superóxido a  $H_2O_2$ ; e a glutatona peroxidase que catalisa a decomposição de peróxidos através da oxidação da glutatona reduzida (GSH) formando glutatona oxidada (GSSH). E as defesas não enzimáticas são as vitaminas (como o ácido ascórbico, vitamina E e vitamina A) e a GSH (Halliwell, 2001). Do ponto de vista biológico, um antioxidante é um composto que, quando presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, reage com as espécies reativas, regenerando o substrato ou prevenindo significativamente a oxidação do mesmo, e assim impedindo a propagação da reação em cadeia (Bergendi et al., 1999; Halliwell, 2000).

#### **I.1.5.1 Creatina**

A creatina é encontrada no músculo esquelético e sintetizada endogenamente pelo fígado, rins e pâncreas a partir dos aminoácidos glicina, arginina e metionina e é armazenada em outros tecidos, como coração, músculo liso, testículos e cérebro (Wyss & Schulze, 2002). Nas células humanas, 60% a 70%, aproximadamente, correspondem à forma livre e 30% a 40%, à forma fosforilada (fosfocreatina). A creatina tem um papel crítico no metabolismo energético, pois sua principal função ocorre quando se encontra na forma fosforilada, agindo como uma doadora de grupo fosforil para moléculas de ADP, regenerando o ATP, principalmente no músculo esquelético, onde é degradada em condições de alta demanda energética dentro da célula (Wallimann et al., 1998). O transportador de creatina (SLC6A8) é expresso na barreira hematoencefálica e regula a concentração de creatina no cérebro, representando uma via para o fornecimento de creatina da circulação sanguínea para o cérebro (Tarnopolsky, 2007). Estudos recentes

com a suplementação de creatina demonstram as propriedades antioxidantes desse composto (Sestili et al., 2006; Hersch et al., 2006). A creatina desempenha a tarefa de eliminar espécies reativas e melhorar o estado energético da célula (Wyss e Schulze, 2002), portanto, desempenha um papel antioxidante primário significativo, havendo uma relação direta da concentração de creatina com a neutralização do radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e com o peroxinitrito ( $OONO^{\cdot}$ ) (Lawler et al., 2002). Além disso, a creatina não possui atividade antioxidante contra hidroperóxidos como o  $H_2O_2$ , sugerindo que a creatina apresenta uma capacidade antioxidante seletiva (Wyss & Schulze, 2002). O composto exerce uma atividade citoprotetora antioxidante direta em diferentes linhagens de células contra diversos agentes oxidativos (Sestili et al., 2006). A creatina também regula o crescimento de axônios e a densidade sináptica, reduz o acúmulo de glutamato extracelular, estabiliza os níveis de cálcio dentro da célula e inibe a transição de permeabilidade mitocondrial, prevenindo assim a apoptose em doenças neurodegenerativas, neuromusculares e neurometabólicas (Bender et al., 2006; Hersch et al., 2006; Tarnopolsky, 2007; Bolaños et al., 2009).

### **I.1.5.2 Piruvato**

O piruvato desempenha um papel chave no metabolismo intermediário como um produto da glicólise e fonte de acetil-CoA, conectando a via glicolítica com o ciclo do ácido tricarboxílico. O piruvato é considerado um poderoso agente antioxidante e neuroprotetor, pois é capaz de oferecer resistência ao estresse oxidativo e ao insulto mitocondrial. Isso ocorre devido a sua capacidade de sequestrar  $H_2O_2$  impedindo os efeitos danosos deste radical na célula. O  $H_2O_2$  é pouco reativo, porém penetra facilmente na membrana celular induzindo a produção de outras espécies reativas, e causa apoptose devido ao aumento na atividade da caspase 3 e a perda do potencial de

membrana na mitocôndria (Mazzio e Soliman, 2003; Andrae et al, 1985; Japtag et al, 2003).

O piruvato é um substrato energético que produz ATP mesmo na ausência de glicose, atua na homeostase energética restaurando os níveis de ATP na célula. Desse modo, protege neurônios contra a toxicidade e morte celular induzida pelo glutamato e receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), e previne o acúmulo de glutamato em células submetidas a privação de glicose (Maus, 1999).

### **I.1.5.3 Taurina**

A taurina é um  $\beta$ -aminoácido condicionalmente essencial, obtido diretamente da dieta e indiretamente, pela sua biossíntese a partir dos aminoácidos metionina e cisteína no fígado, sendo de grande necessidade na fase de desenvolvimento do sistema nervoso, rins e retina. Encontrado de forma livre no líquido intracelular atinge concentração de 10 a 100 $\mu$ M no plasma, 30 a 40 mM no cérebro e concentrações de 50 e 70 mM nos neutrófilos e na retina, respectivamente (Green et al., 1991; Sturman, 1993). As concentrações mais altas de taurina ocorrem no cérebro em desenvolvimento, sendo que o nível de taurina no indivíduo adulto é de aproximadamente um terço dos neonatos (Huxtable, 1992).

Muitos trabalhos demonstram que a taurina possui propriedades antioxidantes e exerce funções citoprotetoras e de vital importância para o organismo, (Bouckenooghe et al., 2006; Cozzi, 1995; Sturman, 1993). Taurina possui habilidade de neutralizar o ácido hipocloroso (HOCl), um potente oxidante, e formar um composto estável, a taurina-cloramina (TnCl), sendo assim capaz de reduzir o dano ao DNA causado por compostos aromáticos de amina *in vitro* (Kozumbo et al., 1992). A taurina também



pode modular o grau de peroxidação lipídica regulando os íons  $\text{Ca}^{2+}$  envolvidos na patogênese do dano celular mediada por radicais livres (Braughter, 2005, Wang et al., 2005). A taurina possui ação antioxidante e de 'scavenger' contra a maioria das espécies oxidativas, como ânions superóxidos (Kilic et al., 1999), óxido nítrico, peroxinitrito, radical peroxil (Oliveira et al., 2010) e no entanto, não possui reatividade contra o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Wang et al., 1995; Arouma et al., 1988).

A taurina tem sido usada no tratamento de doenças cardiovasculares, hepáticas e neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington (Sturman, 1993). Também é adicionada a fórmulas alimentícias de bebês prematuros e neonatos mantidos durante muito tempo em nutrição parenteral total (Chesney, 1988).

## **2. OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo geral**

Considerando que pacientes com a doença da urina do xarope do bordo manifestam sintomas neurológicos na infância, o objetivo geral deste trabalho foi investigar, através de um modelo crônico de hiperleucinemia, o efeito da leucina sobre parâmetros bioquímicos do metabolismo energético e de estresse oxidativo em córtex cerebral e hipocampo de ratos Wistar. Além disso, investigamos o papel protetor da creatina, piruvato e taurina sobre possíveis alterações bioquímicas observadas no modelo de hiperleucinemia.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- 1 - Determinar o efeito da administração subcutânea de 4,8  $\mu\text{mol/g}$  de leucina sobre parâmetros do metabolismo energético e de estresse oxidativo em córtex cerebral e hipocampo de ratos Wistar de 21 dias de idade.
- 2 - Determinar o efeito neuroprotetor da administração intraperitoneal de 0,4  $\mu\text{mol/g}$  de creatina e 0,2  $\mu\text{mol/g}$  de piruvato sobre parâmetros do metabolismo energético e de estresse oxidativo em córtex cerebral e hipocampo de ratos Wistar de 21 dias de idade.
- 3 - Determinar o efeito neuroprotetor da administração intraperitoneal de 1,6  $\mu\text{mol/g}$  de taurina sobre parâmetros do metabolismo energético e de estresse oxidativo em córtex cerebral e hipocampo de ratos Wistar de 21 dias de idade.

**PARTE II**

**ARTIGOS CIENTÍFICOS**

## **II. CAPÍTULO 1 – Artigo 1**

**Neuroprotective effect of creatine and pyruvate on enzymes activities of phosphoryl transfer network and oxidative stress alterations caused by leucine administration in Wistar rats**

Elenara Rieger, Itiane Diehl de Franceschi, Thales Preissler, Clovis Milton Duval Wannmacher

**Periódico:** Neurotoxicity Research

**Status:** Publicado em 13 Junho de 2017; doi: 10.1007/s12640-017-9762-5

**Neuroprotective effect of creatine and pyruvate on enzymes activities of phosphoryl transfer network and oxidative stress alterations caused by leucine administration in Wistar rats**

Elenara Rieger, Itiane Diehl de Franceschi, Thales Preissler, Clovis Milton Duval Wannmacher

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

Corresponding Author: Clovis M. D. Wannmacher

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

Telephone 55 51 33085576

Fax 55 51 33085535

E-mail. [clovisdw@ufrgs.br](mailto:clovisdw@ufrgs.br)

Key Words: creatine; pyruvate; oxidative stress; leucine; phosphoryl transfer network; Maple Syrup Urine Disease.

## Abstract

Maple Syrup Urine Disease is an autosomal metabolic disease caused by a deficiency of branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex activity. In this disease occur the accumulation of the branched-chain amino acids leucine, isoleucine and valine and their corresponding branched-chain  $\alpha$ -keto acids in the tissues and body fluids. The affected patients may present psychomotor development delay and mental retardation. The pathophysiology of Maple Syrup Urine Disease is not entirely understood, but leucine seems to be the primary neurotoxic metabolite. Creatine and pyruvate are energetics and antioxidants substances. In this study, we investigated the effects of leucine administration and co-administration of creatine plus pyruvate on several parameters of oxidative stress and phosphoryl transfer network in cerebral cortex and hippocampus of Wistar rats treated from the 8<sup>th</sup> to the 21<sup>st</sup> postpartum day. Leucine induced oxidative stress and diminished the activities of pyruvate kinase, adenylate kinase, cytosolic and mitochondrial creatine kinase. Co-administration of creatine plus pyruvate prevented the alterations provoked by leucine administration on the oxidative stress and the enzymes of phosphoryltransfer network. These results indicate that chronic administration of leucine may stimulate oxidative stress and alters the enzymes of phosphoryltransfer network in the cerebral cortex and hippocampus of the rats. It is possible that these effects may contribute, along with other mechanisms, to the neurological dysfunction found in patients affected by Maple Syrup Urine Disease. In this case, it is possible that creatine plus pyruvate supplementation could benefit to the patients.

## Introduction

Maple Syrup Urine Disease (MSUD) is caused by a severe deficiency in the activity of the branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex (BCKAD). As a consequence, the branched-chain amino acids (BCAA) leucine (Leu), isoleucine (Ile) and valine (Val), and their corresponding transaminated branched-chain  $\alpha$ -keto acids (BCKAs)  $\alpha$ -ketoisocaproic,  $\alpha$ -keto- $\beta$ -methylvaleric acid and  $\alpha$ -ketoisovaleric acid accumulate in tissue and body fluids (Chuang and Shih 2001).

MSUD presents heterogeneous molecular and clinical phenotypes ranging from a classic severe form with neonatal onset to milder variants forms with later onset and presenting different residual enzyme activity (Chuang and Shih 2001). Individuals with classical MSUD usually present poor feeding, convulsions, ketoacidosis, apnea, hypoglycemia, coma, ataxia, psychomotor delay and mental retardation. They may show generalized edema and hypomyelination/demyelination on magnetic resonance imaging studies of the central nervous system (CNS) (Chuang and Shih 2001; Schönberger 2004). Therapy for this disease is based on a protein-restricted diet with low BCAA supplemented with a semi-synthetic formula of essential amino acids, vitamins, and minerals (Strauss et al. 2010). This treatment minimizes the accumulation of the toxic metabolites and contributes to the survival of the affected individuals. However, this treatment does not prevent a variable degree of neurological dysfunction evidenced by development delay and mental retardation whose pathogenesis is poorly known (Chuang and Shih 2001). It is known that leucine and/or  $\alpha$ -ketoisocaproate are the main important neurotoxic metabolites in this disorder once their increased concentrations have been associated with the appearance of neurological symptoms (Chuang and Shih 2001; Snyderman et al. 1964).

Several studies show that oxidative stress and alteration of brain energy metabolism are associated with the pathophysiology of several neurodegenerative disorders (Halliwell 2001; Mochel 2012; Beal 1995, 2000; Hayashi 2012; Reed 2011). Oxidative stress and alteration of brain energy also occur in animal models of inborn errors of metabolism, as hyperprolinemia (Kessler 2003), hyperphenylalaninemia (Costabeber 2003), tyrosinemia (de Andrade 2012), tryptofanemia (Cornelio 2004; Feksa 2008), and maternal hyperleucinemia (de Franceschi et al. 2013).

Previous studies demonstrated that leucine impairment of energy metabolism by inhibiting creatine kinase (CK) and pyruvate kinase (PK) activities (Pilla et al. 2003; Feksa et al. 2005). The CK activity is severely reduced in some neurodegenerative diseases (Akzenov et al. 2000), and this inhibition may lead to neuronal loss in the brain (Tomimoto et al. 1993). Inhibition of PK activity could reduce pyruvate content, an important antioxidant agent (Das 2006). Leucine also provokes an impairment mitochondrial function in rat brain (Amaral et al. 2010) and increases lipid peroxidation and decreases antioxidant defenses in rat brain (Bridi et al. 2003, 2005). Leucine administration to female Wistar rats during pregnancy and lactation induces oxidative stress and alters parameters of phosphoryl transfer network in the brain cortex and hippocampus of the offspring (de Franceschi et al. 2013). Leucine causes DNA damage via free radical production (Mescka et al. 2014), and oxidative damage was observed in plasma (Barschak 2006, 2008a, 2008b, 2009; Mescka et al. 2013) and urine of MSUD patients (Guerreiro et al. 2015).

As a consequence of the high cost of treatment, novel alternative therapies for MSUD have been sought. Creatine (Cr) and pyruvate (Pyr) are important substrates energetics and antioxidants. Cr has antioxidant properties protecting cells against superoxide anion and peroxynitrite (Lawler et al. 2002; Matthews et al. 1998; Sartini 2012; Sestili 2006). Also, Cre supplementation can protect neurons against neurotoxins *in vitro* (Brewer and Wallimann 2000) and has a neuroprotective effect on neurodegenerative diseases, such as in Huntington's and Parkinson's disease (Beal 2011; Ferrante 2000; Tarnopolsky 2007; Bender et al. 2006). Pyruvate is an antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective agent (Desagher et al. 1997; Das 2006; Kim et al. 2005). Pyr readily scavenges hydrogen peroxide in cultured cells (O'Donnell-Tormey 1987; Jagtap 2003); prevents energy decline (Vlassenko et al. 2006) and neuronal apoptosis (Araki et al. 2004; Zeng et al. 2007; Mukherjee et al. 1997). Pyr enriched-diet can prevent neuronal malfunctions and energy metabolism deficiency early Alzheimer's disease-related (Zilberter et al. 2013). Furthermore, Pyr therapy showed clinical benefits in patients with Leigh syndrome, a mitochondrial disorder (Koga et al. 2012). It is conceivable that the combination of creatine and pyruvate can prevent damage in some diseases that alter brain energy metabolism and/or oxidative stress, such as some inborn errors of metabolism. The association of creatine and pyruvate prevented some damage in animal models of phenylketonuria (Berti et al.



2012; dos Reis et al. 2013), tryptofanemia (Andrade et al. 2012) and maternal hyperleucinemia (de Franceschi et al. 2013).

Considering that the mechanisms responsible for the neurological dysfunction in patients with maple syrup urine disease are not fully known and that oxidative stress and deficiency of energy metabolism have been implicated in various inborn errors of metabolism (de Andrade et al. 2015; Gemelli et al. 2013; Mescka et al. 2011; Artuch et al. 2004) and neurodegenerative disorders (Halliwell 2006), in the present study, we investigated the effects of leucine administration and the possible preventive effect of the co-administration of the association of creatine and pyruvate on some parameters of oxidative stress and of some enzymes activities of phosphoryl transfer network in the cerebral cortex and hippocampus of the Wistar rats with 21-days-old.

## Materials and Methods

### Animals and Reagents

Wistar rats were obtained from the Central Animal House of Biochemistry Department, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. They were maintained on a 12:12-h light/dark cycle in a room acclimatized at constant temperature ( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), with free access to water and commercial chow. This chow contains 20.5% protein (predominantly soybean supplemented with methionine), 54% carbohydrate, 4.5% fiber, 4% lipid, and 10% moisture. Animal care followed the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication no. 80-23, revised 1996; <http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/>) and was approved by the UFRGS Ethical Committee. All efforts were made to minimize animal suffering and to use only the number of animals necessary to produce reliable scientific data. All chemicals were purchased from Sigma

### Treatment of rats

Rats ( $n=24$ ) were randomly divided into four groups: saline, leucine, creatine+pyruvate, and leucine+creatine+pyruvate. Before the administration, the solutions were buffered to pH 7.4. The rats received twice a day, at a 12-h interval, during 14 days (from the 8th to the 21st day of life), subcutaneous administration of L-leucine or saline and intraperitoneal administration of creatine+pyruvate or saline.

Doses used were: 4.8  $\mu$ mol of L-leucine per g of body weight (Pilla et al. 2003); 0.4 mg of creatine per g of body weight (Stokler et al. 1994); 0.2 mg of pyruvate per g of body weight (Ryu et al. 2006). The rats were euthanized at 22 days of age.

#### Tissue Preparation

The animals were decapitated. The brain was immediately removed, and cerebral cortex and hippocampus were dissected on a glass dish over ice. For the assays of the oxidative stress parameters, the cerebral cortex and hippocampus were homogenized separately with (1:10 w/v) of 20 mM sodium phosphate and 140 mM KCl buffer (pH 7.4) using a Potter-Elvehjem glass homogenizer and centrifuged at 800 x g for 10 min at 4°C. The supernatant was collected and frozen at -70°C for no more than 1 week until a determination of the parameters of oxidative stress and protein.

For assays of the enzymes of phosphoryl transfer network, the cerebral cortex and hippocampus were washed in SET buffer (0.32 M sucrose, 1 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) and homogenized (1:10 w/v) in SET buffer with a Potter-Elvehjem glass homogenizer. The homogenate was centrifuged at 800xg for 10 min at 4°C. Part of the supernatant was used for determination of AK activity and the rest was centrifuged at 10,000xg for 15 min at 4°C. The supernatant of this second centrifugation, containing cytosol and others cellular components was used for determination of PK and CKcyt activities. The pellet was washed twice with the same SET buffer, resuspended in 100 mM Trizma-15 mM MgSO<sub>4</sub>-buffer, pH 7.5, and used for determination of CKmit activity. The supernatants were stored for no more than 1 week at -70°C when the assay was not carried out immediately.

#### Measurements of Oxidative Stress Parameters

##### Thiobarbituric Acid-Reactive Substances

TBA-RS were measured as described previously by Ohkawa et al. (1979). TBA-RS determines malondialdehyde (MDA) and others dialdehydes, the product of lipoperoxidation caused by hydroxyls free radicals. These free radicals are formed from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by the iron-catalyzed Fenton reaction or by the Haber-Weiss reaction (Kehrer JP, 2000). TBA-RS were expressed as nmol of TBA per mg of protein.

##### 2',7'-Dihydrodichlorofluorescein Oxidation Assay

The production of reactive oxygen and nitrogen species was assessed according to LeBel et al. (1992) by using reduced 2',7'-dihydro dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA). Reduced 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) is enzymatically hydrolyzed by intracellular esterases, and the H<sub>2</sub>DCF formed is oxidized by reactive oxygen species (ROS) or reactive nitrogen species (RNS) presenting in samples to DCF. The DCF fluorescence intensity parallels to some reactive species formed. The content of reactive species was expressed as nmol of DCF formed per mg of protein.

#### Total Sulfhydryl Content

The sulfhydryl assay is based on the reduction of 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by sulfhydryls generating TNB, whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm (Aksenov and Markesbery 2001). The sulfhydryl content is indicative of oxidative damage to proteins. Results were expressed as nmol of TNB per mg of protein.

#### Superoxide Dismutase (SOD)

SOD is responsible for the dismutation of superoxide free radicals in hydrogen peroxide, a less reactive substance. SOD activity was determined according to Marklund (1985). This assay is based on the capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on the superoxide radical in the presence of SOD, whose activity can be indirectly assayed spectrophotometrically at 420 nm. The specific activity was expressed as SOD units per mg of protein.

#### Glutathione Peroxidase

GPx activity was measured according to Wendel (1981) using tert-butylhydroperoxide as substrate. One GPx unit is defined as 1  $\mu$ mol of NADPH consumed per minute, and specific activity was expressed as  $\mu$ mol of NADPH consumed per min per mg of protein.

#### Measurements of Parameters of Phosphoryltransfer Network

##### Pyruvate kinase activity

PK activity was assayed as described by Leong et al (1981). The incubation medium consisted of 0.1 M Tris/ HCl buffer, pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.16 mM NADH, 75 mM KCl, 5.0 mM ADP, 7 U of L-lactate dehydrogenase, 0.1% (v/v) Triton X-100, and 10 ml of the mitochondria-free supernatant in a final volume of 0.5 ml. After 30 min of pre-incubation at 37°C, the reaction was started by the addition of 1.0 mM phosphoenolpyruvate. The oxidation of NADH was followed for 3 min at 340 nm in a spectrophotometer (Spectronic Genesys 8, Spectronic Instruments, Rochester, New York, USA). All assays were performed in duplicate at 25°C. The results were expressed as  $\mu\text{mol}$  of pyruvate per min per mg of protein.

#### Adenylate kinase activity

AK activity was measured with hexokinase (HK) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), according to Dzeja et al (1999). The reaction assay contained 100 mM KCl, 20 mM HEPES, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM glucose, 1 mM EDTA, 2 mM NADP<sup>+</sup>, 4.5 U/ml of HK, 2 U/mL of G6PD, and 1  $\mu\text{g}$  of protein homogenate. After 0–90 min of pre-incubation at 37°C, the reaction was initiated by the addition of 2 mM ADP. The reduction of NADP<sup>+</sup> was followed for 3 min at 340 nm in a spectrophotometer (Spectronic Genesys 8, Spectronic Instruments, Rochester, New York, USA). ADP, NADP<sup>+</sup>, G6PD, and HK were dissolved in water. The reagents concentration and the assay time (3 min) were chosen to assure the linearity of the reaction. GSH did not interfere with HK or G6PD activities or with spectrophotometric readings. The results were expressed in  $\mu\text{mol}$  of ATP formed per min per mg of protein.

#### Creatine kinase activity

CK activity was assayed in the reaction mixture contained the following final concentrations: 65 mM Tris–HCl buffer, pH 7.5, 7.0 mM phosphocreatine, 9.0 mM MgSO<sub>4</sub>, and 1  $\mu\text{g}$  of protein in a final volume of 0.1 ml. After 5 min of pre-incubation at 37°C, the reaction was started by the addition of 0.3  $\mu\text{mol}$  of ADP. The reaction was stopped after 10 min by the addition of 1  $\mu\text{mol}$  of p-hydroxymercuribenzoic acid. The incubation time and the reagent concentrations were chosen to assure linearity of the enzymatic reaction. Appropriate controls were carried out to measure chemical hydrolysis of phosphocreatine. The creatine formed was determined according to the method of Hughes (1962). The color was developed by the addition of 0.1 ml 2%  $\alpha$ -

naphthol and 0.1 ml 0.05% diacetyl in a final volume of 1 ml and read after 20 min at 540 nm. None of the substances added to the assay medium interfered with the color development or spectrophotometer readings. Results were expressed as  $\mu\text{mol}$  of creatine formed per min per mg of protein.

### Protein Determination

The protein content of hippocampus or cerebral cortex homogenates was determined by the method of Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as the standard.

### Statistical Analysis

Data were expressed as mean $\pm$ SD and were analyzed by two-way ANOVA (leucine and creatine+pyruvate as factors). When appropriate, the comparison between means was analyzed by the Tukey test when the F value was significant. Correlation between some parameters of oxidative stress and the activities of the enzymes of the phosphoryl transfer network was performed by the Spearman's correlation coefficient. Data were analyzed by the Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS 20.0 for Windows). P values lower than 0.05 were considered significant.

### Results

Data of the experiments are showed in Table 1 and the Spearman's correlation coefficient in Table 2. The effect of the treatments on the generation of reactive species was assessed by DCFH oxidation. Leucine administration increased reactive species formation in the cerebral cortex (11%) and hippocampus (11%). A significant interaction between leucine and creatine plus pyruvate in the cerebral cortex [ $F(1,20) = 28.1$ ;  $p < 0.05$ ] and the hippocampus [ $F(1,20) = 6.18$ ;  $p < 0.05$ ] indicated that co-administration of leucine and creatine plus pyruvate prevented reactive species formation.

The effect of the treatments on lipid damage was evaluated by TBARS levels. Leucine administration caused a significant increase in the cerebral cortex (13%) and hippocampus (13%). Two-way ANOVA showed a significant interaction between leucine and creatine plus pyruvate in the cerebral cortex [ $F(1,20) = 5.5$ ;  $p < 0.05$ ] and in

the hippocampus [ $F(1,20) = 5.8$ ;  $p < 0.05$ ], indicating that co-administration of creatine plus pyruvate was effective to prevent the lipid peroxidation.

Reduced power was assessed by total sulfhydryls content. Leucine administration increased the sulfhydryls content significantly in the cerebral cortex (13%) and hippocampus (12%). Significant interaction between leucine and creatine plus pyruvate showed that and co-administration of creatine plus pyruvate prevented this increase in cerebral cortex [ $F(1,20) = 5.6$ ;  $p < 0.05$ ] and hippocampus [ $F(1,20) = 13.5$ ;  $p < 0.05$ ].

In respect to the antioxidant enzymes, GPx and SOD activities were evaluated. GPx activity was reduced by leucine administration in the cerebral cortex (20%) and hippocampus (20%) of the rats. However, SOD activity was significantly decreased only in the cerebral cortex (17%) by leucine administration. The significant interaction between leucine and creatine plus pyruvate indicated that the diminution of the activities of GPx in the cortex [ $F(1,20) = 4.9$ ;  $p < 0.05$ ] and hippocampus [ $F(1,20) = 32.1$ ;  $p < 0.05$ ] and SOD in the cerebral cortex [ $F(1,20) = 4.2$ ;  $p < 0.05$ ] were prevented by co-administration of creatine plus pyruvate .

Thiol-containing enzymes of the phosphoryl transfer network were also evaluated. Chronic administration of leucine decreased the activities of AK (18%), CKcyt (20%) and CKmit (28%) in the brain cortex and hippocampus AK (36%), CKcyt (20%) and CKmit (27%). However, PK activity was diminished only in the hippocampus (31%). Significant interactions between leucine and creatine plus pyruvate were found for AK activity in the cortex [ $F(1,20) = 11.1$ ;  $p < 0.05$ ] and hippocampus [ $F(1,20) = 8.9$ ;  $p < 0.05$ ]; for CKcyt in the cortex [ $F(1,20) = 6.7$ ;  $p < 0.05$ ] and hippocampus [ $F(1,20) = 4.7$ ;  $p < 0.05$ ]; for CKmit in the cerebral cortex [ $F(1,20) = 8.7$ ;  $p < 0.05$ ] and hippocampus [ $F(1,20) = 5.3$ ;  $p < 0.05$ ]; for PK in the hippocampus [ $F(1,20) = 5.3$ ;  $p < 0.05$ ]. These interactions indicated that co-administration of creatine plus pyruvate prevented the reduction of the enzymes activities. Spearman's correlation coefficients between DCFH oxidation and total sulfhydryl content were 0.598 ( $p < 0.05$ ) for the cerebral cortex and 0.491 ( $p < 0.05$ ) for the hippocampus, suggesting that the diminution of sulfhydryl content could be due to the oxidation of the thiol groups by reactive species. On the other hand, Spearman's correlation coefficients between DCFH oxidation or total sulfhydryl content and the enzymes activities of the phosphoryl

transfer network were significant, except for PK activity in the cerebral cortex (Table 2).

## Discussion

Animal models are only partially similar to human diseases in all its complexity. However, chemical animal models have been used because they have the advantage of studying every substance known to accumulate in human disease against adequate control. Therefore, animal models are important in the investigation of pathophysiologic mechanisms of the diseases, helping to suggest preventive measures and new drugs for treatment (Skvorak 2009).

Leucine and its keto acid (KIC) may achieve up to 5 mM in the plasma of MSUD patients and are considered the main neurotoxic metabolites (Chuang and Shih, 2001). However, KIC is rapidly taken up by neurons and actively transaminated to Leu, increasing the concentration of this amino acid in the brain tissue (Yudkoff, 1997). In the present investigation, the rats present normal BCKD activity, indicating that the others amino acids and keto acids have normal levels. Therefore, the observed effects of Leu administration are possible due to this amino acid.

Leucine administration induces oxidative damage and inhibits critical enzymes of metabolism cellular in the cerebral cortex of rats (Bridi et al. 2005) and offspring of maternal hyperleucinemia (de Francheschi et al. 2013). Therefore, we investigated the possible effects of chronic administration of leucine on the enzymes of phosphoryl transfer network that are crucial for energy homeostasis and oxidative stress parameters in cerebral cortex and hippocampus from 21-day-old Wistar rats. Moreover, we investigated the possible preventive effect of the co-administration of creatine plus pyruvate, two important energetic and antioxidants substances, on these parameters.

The oxidative stress is an imbalance between the generation of reactive species and antioxidant mechanisms in favor for the former, causing excessive oxidative damage (Halliwell and Gutteridge, 2015). The reactive species may contribute significantly to the neurodegenerative diseases (Halliwell 2013). The brain is particularly vulnerable to oxidative stress, due to its high rate of oxidative metabolism, the high content of polyunsaturated compounds, and the moderate levels of antioxidant defenses compared with other tissue (Halliwell and Gutteridge, 1996; Halliwell, 1999). We observed an increased in DCFH oxidation, suggesting that leucine provokes an increase in the reactive species generation in cerebral cortex and hippocampus. Co-

administration of creatine plus pyruvate prevents this increase. The influence of leucine administration on lipid oxidation was investigated by TBA-RS determination. TBA-RS reflect the content of malondialdehyde, the most abundant individual aldehyde resulting from lipid peroxidation (Esterbauer and Cheeseman 1990). We have demonstrated that leucine can increase TBA-RS levels in cerebral cortex and hippocampus of rats, suggesting that oxidative damage to lipids has occurred. Moreover, co-administration of creatine plus pyruvate prevented the lipid peroxidation.

Leucine administration was able to increase total thiol levels in the hippocampus. This increase can be explained by the increase of reactive species that react with disulfide bonds (S-S) in proteins, as protein sulfhydryl content is a useful index of protein oxidation (Stadtman 2003) or to increase in GSH synthesis since oxidative stress is the major stimulus for GSH synthesis (Lu 2009). Moreover, co-administration of creatine plus pyruvate was able to prevent the increase of total thiol levels.

Regarding the activities of antioxidant enzymes, SOD plays a vital role in the protection of aerobic cells against the effects of superoxide anion, catalyzing the transfer of superoxide free radicals to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Marklund 1985), which in turn is removed by GPx by coupling the oxidation reaction of GSH (Leong 1981). In the cerebral cortex, the administration of leucine diminished SOD activity, which may suggest higher superoxide radical, since this radical inhibits SOD activity, and decreases GPx activity, suggesting high liberation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In this context, it is possible that hydroxyl radical, the most toxic in vivo reactive specie, might be formed via the Haber-Weiss/Fenton reaction (Change 1979; Halliwell 2013). On the other hand, GPx activity was reduced by leucine administration in the two tissues, probably because anion superoxide can inhibit this enzyme activity (Macedo 2013). Moreover, co-administration of creatine plus pyruvate prevented these alterations.

We evaluated the activity of four kinases of phosphoryltransfer network: cytosolic creatine kinase (CK<sub>cyt</sub>), mitochondrial creatine kinase (CK<sub>mit</sub>), adenylate kinase (AK) and pyruvate kinase (PK). This enzymatic network is important to support high-energy phosphoryl transfer between ATP-generating and ATP-consuming processes cellular. (Wallimann et al. 1992; Dzeja and Terzic 1998). This dynamic metabolic signaling maintains the balance between cellular ATP consumption and production, maintaining the energetic homeostasis for preserving cell survival (Dzeja



and Terzic 2003; Dzeja et al. 2000). The creatine/phosphocreatine/creatine kinase (Cr/PCr/CK) system plays essential roles to maintain the high energy levels necessary for central nervous system (Wyss 2000). The deficit in the central nervous system energy metabolism play critical role in the progression of neurological diseases (Beal 2000; Chaturvedi 2008). AK is the main responsible for the enzymatic phosphoryl transfer network, catalyzing the reversible transfer of phosphate between ATP and AMP from mitochondria to the cytosol (Dzeja and Terzic 2003; Price et al. 1975). PK is a key enzyme of glucose metabolism, catalyzing the irreversible conversion of PEP to pyruvate and forming ATP from ADP (Valentini et al. 2000).

We observed that AK, CK<sub>cyt</sub>, and CK<sub>mit</sub> activities were inhibited by leucine administration in the cerebral cortex and hippocampus, and PK in the hippocampus. Moreover, co-administration of creatine plus pyruvate was able to prevent the inhibition of the kinases in cerebral cortex and hippocampus.

A diminished activity of a single enzyme of the phosphoryl transfer network may be compensated by the others. However, a decrease in the activity of two or more enzymes of this network could lead to a significant alteration in the communication between ATP-generating and ATP-consuming sites (Dzeja et al. 2000). Kinases are enzymes containing thiol groups in their structure, may alter the activities by oxidative stress (Gilbert 1984). For example, CK activity can be inactivated by anion superoxide (Wendt et al. 2003) and PK activity can be inactivated by hydrogen peroxide (Halliwell and Gutteridge 2007). Several amino acids can induce oxidative stress (Halliwell and Gutteridge, 2015). The amino acids cystine (Feksa et al. 2004; Figueiredo et al. 2009; Fleck 2005), phenylalanine (Feksa et al. 2003; Costabeber et al. 2003), tyrosine (de Andrade et al. 2012) and  $\beta$ -alanine (Gemelli et al. 2013) also inhibit these kinases, possibly by oxidation of the sulfhydryl groups of the enzymes. In this study, a significant correlation was found between the formation of reactive species (DCFH oxidation) and the inhibition of the kinases (except for PK in cerebral cortex). Besides, we found a significant correlation between total sulfhydryl content and the inhibition of the kinases. These data suggest that it is possible that the inhibition of the kinases activities might occur through the action of the reactive species on the thiol groups of the kinases. Therefore, it is possible that the induction of oxidative stress and the consequent alteration of the energy homeostasis may significantly contribute to the brain damage observed in many inborn errors of the metabolism of the amino acids.

Therefore, the inhibition of enzymes activities in the phosphoryltransfer network is possibly caused by oxidative stress induced by administration of leucine. Alteration of energy homeostasis and oxidative stress may induce apoptosis and brain cells death (Burlacu et al. 2001; Park and Thoene 2005). Moreover, co-administration of creatine plus pyruvate prevented the effects elicited by leucine administration on oxidative stress and phosphoryl transfer network parameters in cerebral cortex and hippocampus, suggesting that creatine and pyruvate acted as antioxidants and energy-supplying substances. The antioxidant properties of creatine may result from different mechanisms of action: direct scavenging of radical species, iron chelation (Halliwell 2001), and amelioration of cellular energy charge (Persky and Brazeau 2001). Creatine supplementation has been effective in a variety of animal/cellular models of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's disease (Klein and Ferrante 2007). Pyruvate is scavenging of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, protects from oxidative stress and mitochondrial insult because of it is an effective neuronal energy substrate from glycolysis and acts as a powerful antioxidant (Mazzio and Soliman 2003). Besides, Pyruvate protects neurons by normalizing cellular energy charge (Andrae et al. 1985).

In conclusion, more studies are needed to elucidate if these mechanisms are involved in the neurological dysfunction and toxicity of leucine presented by patients with MSUD and the possible benefits of creatine plus pyruvate supplementation as a potential adjuvant therapy for this disease.

All procedures performed in studies involving animals were by the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.

#### Acknowledgments

This work was supported by the research grants from, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) number 306928/2014-0, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## References

- Aksenov M, Aksenova M, Butterfield AD, Markesbery WR (2000) Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* 74:2520–2527
- 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* 302:41–145
- Amaral AU, Leipnitz G, Fernandes CG, Seminotti B, Schuck PF, Wajner M (2010) Alpha-ketoisocaproic acid and leucine provoke mitochondrial bioenergetic dysfunction in rat brain. *Brain Res* 1324:75-84
- Andrade VS, Rojas DB, Oliveira L, Nunes ML, de Castro FL, Garcia C, Gemelli T, de Andrade RB, Wannmacher CM (2012) Creatine and pyruvate prevent behavioral and oxidative stress alterations caused by hypertryptophanemia in rats. *Mol Cell Biochem* 362:225–232
- Andrae U, Singh J, Ziegler-Skylakakis K (1985) Pyruvate and related a-ketoacids protect mammalian cells in culture against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *Toxicol let* 28:93-98
- Andres RH, Ducray AD, Schlattner U, Wallimann T, Widmer HR (2008) Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res Bull* 76:329-343
- Araki T, Sasaki Y, Milbrandt J (2004) Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science* 305:1010–1013
- Artuch R, Colomé C, Sierra C, Brandi N, Lambruschini J, Urgate D, Vilaseca MA (2004) A longitudinal study of antioxidant status in Phenylketonuric patients. *Clin Biochem* 37:198-203
- Barschak AG, Sitta A, Deon M, de Oliveira MH, Haeser A, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR (2006) Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis* 21 279-286
- Barschak AG, Marchesan C, Sitta A, Deon M, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR (2008) Maple syrup urine disease in treated patients: biochemical and oxidative stress profiles. *Clin Biochem* 41:317-324
- Barschak AG, Sitta A, Deon M, Barden AT, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR (2008) Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment. *Metab Brain Dis* 23:71-80
- Barschak AG, Sitta A, Deon M, Busanello EN, Coelho DM, Cipriani F, Dutra-Filho CS, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR (2009) Amino acids levels and lipid peroxidation in maple syrup urine disease patients. *Clin Biochem* 42:462-466
- Beal M (2011) Neuroprotective effects of creatine. *Amino Acids* 40:1305–1313
- Beal MF (1995) Aging, energy and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 38:357–366
- Beal MF (2000) Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 23:298–304
- Bender A, Koch W, Elstner M, Schombacher Y, Bender J, Moeschl M, Gekeler F, Müller-Myhsok B, Gasser T, Tatsch K, Klopstock T (2006) Creatine supplementation in Parkinson disease: a placebo controlled randomized pilot trial. *Neurology* 67:1262–1264
- Bender A, Beckers J, Schneider I, Hölter SM, Haack T, Ruthsatz T, Vogt-Weisenhorn DM, Becker L, Genius J, Rujescu D, Irmeler M, Mijalski T, Mader M, Quintanilla-Martinez L, Fuchs H, Gailus-Durner V, de Angelis MH, Wurst W, Schmidt J, Klopstock T (2008) Creatine improves health and survival of mice. *Neurobiol Aging* 29:1404-1411

- Berti SL, Nasi GM, Garcia C, Castro FL, Nunes ML, Rojas DB, Moraes TB, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM (2012) Pyruvate and creatine prevent oxidative stress and behavioral alterations caused by phenylalanine administration into hippocampus of rats. *Metab Brain Dis* 27:79–89
- Brewer GJ, Wallimann TW (2000) Protective effect of the energy precursor creatine against toxicity of glutamate and betaamyloid in rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 74:1968–1978
- Bridi R, Araldi J, Sgarbi MB, Testa CG, Durigon K, Wajner M, Dutra-Filho CS (2003) Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Int J Devl Neuroscience* 21:327-332
- Bridi R, Latini A, Braun CA, Zorzi GK, Wajner M, Lissi EG, Dutra-Filho CS (2005) Evaluation of the mechanisms involved in leucine induced oxidative damage in cerebral cortex of young rats. *Free Radic Res* 39:71–79
- Burlacu A, Jinga V, Gafencu AV, Simionescu M (2001) Severity of oxidative stress generates different mechanisms of endothelial cell death. *Cell Tissue Res* 306:409–416
- Change B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527-605
- Chuang DT, Shih VE (2001) Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (ed) *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*, 8rd edn. McGraw-Hill, New York, pp 1667-1724
- Cornelio AR, Rodrigues V Jr, de Souza Wyse AT, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wannmacher CM (2004) Tryptophan reduces creatine kinase activity in the brain cortex of rats. *Int J Dev Neurosci* 22:95–101
- Costabeber E, Kessler A, Severo Dutra-Filho C, de Souza Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM (2003) Hyperphenylalaninemia reduces creatine kinase activity in the cerebral cortex of rats. *Int J Dev Neurosci* 21:111-116
- Das UN (2006) Pyruvate is an endogenous anti-inflammatory and anti-oxidant molecule. *Med Sci Monit* 12:79–84
- de Andrade RB, Gemelli T, Rojas DB, Funchal C, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM (2012) Tyrosine impairs enzymes of energy metabolism in cerebral cortex of rats. *Mol Cell Biochem* 364:253–261
- de Andrade RB, Gemelli T, Rojas DB, Bonorino NF, Costa B, Funchal C, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM (2015) Creatine and pyruvate prevent the alterations caused by tyrosine on parameters of oxidative stress and enzymes activities of phosphoryltransfer network in cerebral cortex of wistar rats. *Mol Neurobiol* 51:1184-1194
- de Franceschi ID, Rieger E, Vargas AP, Rojas DB, Campos AG, Rech VC, Feksa LR, Wannmacher CM (2013) Effect of leucine administration to female rats during pregnancy and lactation on oxidative stress and enzymes activities of phosphoryltransfer network in cerebral cortex and hippocampus of the offspring. *Neurochem Res* 38:632-643
- Desagher S, Glowinski J, Premont J (1997) Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *J Neurosci* 17:9060–9067
- Dos Reis EA, Rieger E, de Souza SS, Rasia-Filho AA, Wannmacher CM (2013) Effects of a co-treatment with pyruvate and creatine on dendritic spines in rat hippocampus and posterodorsal medial amygdala in a phenylketonuria animal model. *Metab Brain Dis* 28:509-517
- Dzeja PP, Terzic A (1998) Phosphotransfer reactions in the regulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *FASEB J* 12:523-529

- 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. *Curr Cardiol rep* 2:212-217
- Dzeja PP, Terzic A (2003) Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J Exp Biol* 206:2039–2047
- Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Method Enzymol* 186:407-421.
- Feksa LR, Cornelio AR, Dutra-Filho CS, de Souza Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM (2003) Characterization of the inhibition of pyruvate kinase caused by phenylalanine and phenylpyruvate in rat brain cortex. *Brain Res* 968:199-205
- Feksa LR, Cornelio A, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Wajner M, Wannmacher CM (2004) Inhibition of pyruvate kinase activity by cystine in brain cortex of rats. *Brain Res* 1012:93–100
- Feksa LR, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Wajner M, Wannmacher CMD (2005) The effects of the interactions between amino acids on pyruvate kinase activity from the brain cortex of young rats. *Int J Dev Neurosci* 23:509-514.
- Feksa LR, Latini A, Rech VC, Feksa PB, Koch GD, Amaral MF, Leipnitz G, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wannmacher CM (2008) Tryptophan administration induces oxidative stress in brain cortex of rats. *Metab Brain Dis* 23:221–233
- Ferrante RJ, Andreassen OA, Jenkins BG, Dedeoglu A, Kuemmerle S, Kubilus JK, Kaddurah-Daouk R, Hersch SM, Beal MF (2000) Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 20:4389–4397
- Figueiredo VC, Feksa LR, Wannmacher CM (2009) Cysteamine prevents inhibition of adenylate kinase caused by cysteine in rat brain cortex. *Metab Brain Dis* 24:373–381
- Fleck RMM, Rodrigues-Junior V, Giacomazzi J, Parissoto D, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Wajner M, Wannmacher CMD (2005) Cysteamine prevents and reverses the inhibition of creatine kinase activity caused by cystine in rat brain cortex. *Neurochem Int* 46:391–397
- Gemelli T, de Andrade RB, Rojas DB, Bonorino NF, Mazzola PN, Tortorelli LS, Funchal C, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM (2013) Effect of  $\beta$ -alanine administration on selected parameters of oxidative stress and phosphoryltransfer network in cerebral cortex and cerebellum of rats. *Mol Cell biochem* 380:161-170
- Gilbert HF (1984) Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange. *Method Enzymol* 107:330–351
- Guerreiro G, Mescka CP, Sitta A, Donida B, Marchetti D, Hammerschmidt T, Faverzani J, Coelho DM, Wajner M, Dutra-Filho CS, Vargas CR (2015) Urinary biomarkers of oxidative damage in Maple syrup urine disease: the L-carnitine role. *Int J Dev Neurosci* 42:10-14
- Halliwell B (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18:685–716
- Halliwell B (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97:1634-1658
- Halliwell B (2013) The antioxidant paradox: less paradoxical now? *Br J Clin Pharmacol* 75:637-644
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1996) Oxygen radicals and nervous system. *Trends Neurosci* 8:22–26
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) Free radical in biology and medicine. In: Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death, 4rd edn. Oxford University Press, Oxford, pp 188– 276

- Halliwell B, Gutteridge JMC (2015) *Free Radicals in Biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford, Fifth Edition
- Hayashi M, Miyata R, Tanuma N (2012) Oxidative stress in developmental brain disorders. *Adv Exp Med Biol* 724:278–290
- 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. *Clin Chim Acta* 7:597–603
- Jagtap JC, Chandele A, Chopde BA, Shastry P (2003) Sodium pyruvate protects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediated apoptosis in human neuroblastoma cell line-SK-N-MC. *J Chem Neuroanat* 26:109–118
- Kehrer JP (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149:43–50
- Kessler A, Costabeber E, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM (2003) Proline reduces creatine kinase activity in the brain cortex of rats. *Neurochem Res* 28:1175–1180
- Kim JB, Yu YM, Kim SW, Lee JK (2005) Anti-inflammatory mechanism is involved in ethyl pyruvate-mediated efficacious neuroprotection in the postischemic brain. *Brain Res* 1060:188–192
- Klein AM, Ferrante RJ (2007) The neuroprotective role of creatine. *Subcell Biochem* 46:205–243
- Lawler JM, Barnes WS, Wu G, Song W, Demaree S (2002) Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun* 290:47–52
- LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992) Evaluation of the probe 20,70-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 N, Farr AL, Randal RJ (1951) Protein measurement with a Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Lu SC (2009) Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 30:42–59
- Macedo LGRP, Carvalho-Silva M, Ferreira GK, Vieira JS, Olegário N, Gonçalves RC, Vuolo FS, Ferreira GC, Schuck PF, Dal-Pizzol F, Streck EL (2013) Effect of acute administration of L-tyrosine on oxidative stress parameters in brain of Young rats. *Neurochem Res* 38:2625–2630
- Marklund SL (1985) Pyrogallol autoxidation. In: Greenwald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research*, CRC Press Inc, Boca Raton, pp 243–247
- Matthews RT, Yang L, Jenkins BG, Ferrante RJ, Rosen BR, Kaddurah-Daouk R, Beal MF (1998) Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. *J Neurosci* 18:156–163
- Mazzio E, Soliman KFA (2003) Pyruvic acid cytoprotection against 1-methyl-4-phenylpyridinium, 6-hydroxydopamine and hydrogen peroxide toxicities in vitro. *Neurosci Lett* 337:77–80
- Mazzio EA, Soliman KF (2003) Cytoprotection of pyruvic acid and reduced beta-nicotinamide adenine dinucleotide against hydrogen peroxide toxicity in neuroblastoma cells. *Neurochem Res* 28:733–741
- Mescka C, Moraes T, Rosa A, Mazzola P, Piccoli B, Jacques C, Dalazen G, Coelho J, Cortes M, Terra M, Regla Vargas C, Dutra-Filho CS (2011) In vivo neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis* 26:21–28

- Mescka CP, Wayhs CA, Vanzin CS (2013) Protein and lipid damage in maple syrup urine disease patients: l-carnitine effect. *Int J Dev Neurosci* 31:21–24
- Mescka CP, Wayhs CA, Guerreiro G, Manfredini V, Dutra-Filho CS, Vargas CR (2014) Prevention of DNA damage by L-carnitine induced by metabolites accumulated in maple syrup urine disease in human peripheral leukocytes in vitro. *Gene* 548:294-298
- Mochel F, Durant B, Meng X, O’Callaghan J, Yu H, Brouillet E, Wheeler VC, Humbert S, Schiffmann R, Durr A (2012) Early alterations of brain cellular energy homeostasis in huntington disease models. *J Biol Chem* 287:1361–1370
- Mukherjee SK, Klaidman LK, Yasharel R, Adams JD (1997) Increased brain NAD prevents neuronal apoptosis in vivo. *Eur J Pharmacol* 330:27–34
- O’Donnell-Tormey J, Nathan CF, Lanks K, DeBoer CJ, de la Harpe J (1987) Secretion of pyruvate. An antioxidant defense of mammalian cells. *J Exp Med* 165:500–514
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358
- Owen L and Sunram-Lea SI (2011) Metabolic agents that enhance ATP can improve cognitive functioning: A review of the evidence for glucose, oxygen, pyruvate, creatine, and l-carnitina. *Nutrients* 3:735-755
- Park MA, Thoene JG (2005) Potential role of apoptosis in development of the cystinotic phenotype. *Pediatr Nephrol* 20:441–446
- Persky AM, Brazeau GA (2001) Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. *Pharmacol Rev* 53:161-176
- Pilla C, Cardozo RFO, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Wajner M, Wannmacher CM (2003) Effect of leucine administration on creatine kinase activity in rat brain. *Metab Brain Dis* 18:17-25.
- Price NC, Cohn M, Schirmer RH (1975) Fluorescent and spin label probes of the environments of the sulfhydryl groups of porcine muscle adenylate kinase. *J Biol Chem* 250:644–652
- Povalko YKN, Katayama K, Kakimoto N, Matsuishi T, Naito E, Tanaka M (2012) Beneficial effect of pyruvate therapy on Leigh syndrome due to a novel mutation in PDH E1 $\alpha$  gene. *Brain Develop* 34:87–91
- Reed TT (2011) Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free Radical Biol Med* 51:1302–1319
- Rojas DB, Gemelli T, de Andrade RB, Campos AG, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM (2012) Administration of histidine to female rats induces changes in oxidative status in cortex and hippocampus of the offspring. *Neurochem Res* 37:1031–1036
- Ryu JK, Choi HB, McLarnon JB (2006) Combined minocycline plus pyruvate treatment enhances effects of each agent to inhibit inflammation, oxidative damage, and neuronal loss in an excitotoxic animal model of Huntington’s disease. *Neurosci* 141:1835–1848
- Saks V, Dzeja P, Schlattner U, Vendelin M, Terzic A, Wallimann T (2006) Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-Starling law. *J Physiol* 571:253–273
- Sartini S, Sestili P, Colombo E, Martinelli C, Bartolini F, Ciuffoli S, Lattanzi D, Sisti D, Cuppini R (2012) Creatine affects in vitro electrophysiological maturation of neuroblasts and protects them from oxidative stress. *J Neurosci Res* 90:435–446
- Schönberger S, Schweiger B, Schwahn B, Schwarz M, Wendel U (2004) Dysmyelination in the brain of adolescents and young adults with maple syrup urine disease. *Mol Genet Metab* 82:69–75
- Sestili P, Martinelli C, Bravi G, Piccoli G, Curci R, Battistelli M, Falcieri E, Agostini D, Gioacchini AM, Stocchi V (2006) Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively

- injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 40:837–849
- Skvorak KJ (2009) Animal models of maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis* 32:229–246
- Snyderman SE, Norton PM, Roitman E (1964) Maple syrup urine disease with particular reference to diet therapy. *Pediatrics* 34:454–472
- Stadtman ER, Levine RL (2003) Free-radical mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25:207–218
- Stockler S, Holzbach U, Hanefeld F, Marquardt I, Helms G, Requart M, Hanicke W, Frahm J (1994) Creatine deficiency in the brain: a new, treatable inborn error of metabolism. *Pediatric Res* 36:409–413
- Strauss KA, Wardley B, Robinson D, Hendrickson C, Rider NL, Puffenberger EG, Shelmer D, Moser AB, Morton DH.(2010). Classical maple syrup urine disease and brain development: principles of management and formula design. *Mol Genet Metab* 99:333–345
- Tarnopolsky MA (2007) Clinical use of creatine in neuromuscular and neurometabolic disorders. *Subcell Biochem* 46:183–204
- Tomimoto H, Yamamoto K, Homburger HA, Yanagihara T (1993) Immunoelectron microscopic investigation of creatine kinase BB isoenzyme after cerebral ischemia in gerbils. *Acta Neuropathol* 86:447–455
- Valentini G, Chiarelli LR, Fortin R, Speranza ML, Galizzi A, Mattevi A (2000) The allosteric regulation of pyruvate kinase. *J Biol Chem* 275:18145–18152
- Vlassenko AG, Rundle MM, Raichle ME, Mintun MA (2006) Regulation of blood flow in activated human brain by cytosolic NADH/NAD ratio. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1964–1969
- 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. *Biochem J* 281:21–40
- Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77:325–332
- Wyss M, Kaddurah-Daouk R (2000) Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 80:1107–1213
- Yudkoff, M.(1997). Brain metabolism of branched-chain amino acids. *Glia*, 21: 92–98
- Zeng J, Yang GY, Ying W, Kelly M, Hira K, James TL, Swanson RA, Litt L (2007) Pyruvate improves recovery after PARP-1- associated energy failure induced by oxidative stress in neonatal rat cerebro cortical slices. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:304–315
- Zilberter M, Ivanov A, Ziyatdinova S, Mukhtarov M, Malkov A, Alpár A, Tortoriello G, Botting CH, Fülöp L, Osypov AA, Pitkänen A, Tanila H, Harkany T, Zilberter Y (2013) Dietary energy substrates reverse early neuronal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 125:157–171



Table 1

Effect of leucine and creatine plus pyruvate administration on parameters of oxidative stress and enzymes activities of phosphoryl transfer network in cerebral cortex and hippocampus of rats.

Groups	saline	creatine+pyruvate	leucine	leucine+creatine +pyruvate
<b>CEREBRAL CORTEX</b>				
DCFH	29.4 ± 0.6	31.7 ± 2.1	33.2 ± 0.9*	29.8 ± 1.2
TBARS	1.4 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.8 ± 0.2*	1.6 ± 0.9
Total Sulfhydryls	44.8 ± 5.4	44.7 ± 4.6	56.8 ± 5.9*	46.8 ± 5.5
GPx	7.8 ± 0.3	7.6 ± 0.7	6.3 ± 0.9*	7.3 ± 0.5
SOD	13.4 ± 1.4	13.1 ± 1.1	11.1 ± 0.5*	13.1 ± 1.1
CK mit	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.2	1.3 ± 0.2*	1.8 ± 0.4
CK cyt	2.8 ± 0.4	2.8 ± 0.3	2.2 ± 0.2*	3.1 ± 0.5
AK	1.7 ± 0.4	1.8 ± 0.3	1.4 ± 0.1*	1.9 ± 0.1
PK	1.3 ± 0.3	1.2 ± 0.4	1.1 ± 0.3	1.2 ± 0.3
<b>HIPPOCAMPUS</b>				
DCFH	41.2 ± 2.9	39.1 ± 2.1	45.9 ± 1.1*	40.2 ± 0.5
BARS	1.6 ± 0.1	1.7 ± 0.2	2.1 ± 0.2*	1.7 ± 0.2
Total Sulfhydryls	49.5 ± 3.7	52.1 ± 2.2	59.5 ± 4.4*	49.2 ± 5.6
GPx	10.5 ± 0.9	9.8 ± 0.4	8.4 ± 0.8*	11.2 ± 0.8
SOD	11.6 ± 1.4	12.1 ± 1.1	11.1 ± 1.1	11.6 ± 0.9
CK mit	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.1 ± 0.2*	1.4 ± 0.3
CK cyt	3.4 ± 0.2	3.5 ± 0.4	2.7 ± 0.4*	3.3 ± 0.3
AK	1.1 ± 0.3	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1*	1 ± 0.1
PK	1.7 ± 0.3	1.6 ± 0.3	1.1 ± 0.2*	1.7 ± 0.4

Data are expressed as mean ± SD for 6 animals per group. \* $p < 0.05$  compared to the other groups (two way ANOVA followed by the Tukey test). Abbreviations: DCFH (2',7'-dihydrodichlorofluorescein oxidation assay) expressed as nmol of DCF per mg of protein; TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) expressed as nmol per mg of protein; Sulfhydryl content expressed as nmol of TNB per mg of protein; GPx (glutathione peroxidase) expressed as  $\mu$ mol of NADPH consumed per min per mg of protein; SOD (superoxide dismutase) expressed as SOD U per mg of protein; CKcyt (cytosolic creatine kinase) and CKmit (mitochondrial creatine kinase) expressed as  $\mu$ mol of creatine formed per min per mg of protein; PK (pyruvate kinase) expressed as  $\mu$ mol of pyruvate formed per min per mg of protein; AK (adenylate kinase), expressed as  $\mu$ mol of ATP formed per min per mg of protein.

Table 2

Spearman's correlation coefficient between oxidative stress parameters and enzymes activities of phosphoryl transfer network in cerebral cortex and hippocampus of rats.

Groups	DCFH	Total Sulphydryl
Cerebral cortex		
PK	.303	.433*
AK	.461*	.407*
CKcyt	.552*	.559*
CKmit	.492*	.429*
Hippocampus		
PK	.475*	.420*
AK	.615*	.599*
CKcyt	.601*	.473*
CKmit	.427*	.604*

\* $p < 0.05$  for Spearman's correlation coefficient. Abbreviations: DCFH (2',7'-dihydrodichlorofluorescein; PK (pyruvate kinase); AK (adenylate kinase).CKcyt (cytosolic creatine kinase); CKmit (mitochondrial creatine kinase);

## **II. CAPÍTULO 2 – Artigo 2**

**Taurine prevents the effects of leucine administration to Wistar rats on oxidative stress parameters and enzymes activities of phosphoryl transfer network in Wistar rats**

Elenara Rieger, Itiane Diehl de Franceschi, Vanessa Trindade Bortoluzzi, Clovis Milton Duval Wannmacher

**Periódico:** Molecular Neurobiology

**Status:** Submetido

## **PARTE III**

### **DISCUSSÃO, CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS**

### III.1 DISCUSSÃO

Os mecanismos responsáveis pelos sintomas neurológicos apresentados pelos pacientes com DXB são pouco conhecidos. Nesse sentido, muitos estudos estão sendo desenvolvidos para entender melhor a fisiopatologia da DXB. Existem evidências associando o acúmulo do aminoácido leucina ao surgimento dos sintomas neurológicos nesses pacientes (Chuang e Shih, 2001). Mello e colaboradores (1999) mostraram que a administração crônica de leucina a ratos jovens induz déficit no aprendizado e memória, contribuindo para a deterioração neurológica. Estudos em animais e em pacientes já demonstraram o envolvimento do estresse oxidativo na DXB, sugerindo um aumento na produção de radicais livres e/ou uma diminuição das defesas antioxidantes na doença (Barschak et al., 2006, 2008a, 2008b, 2009; Mescka et al., 2013; Colomé et al., 2000, Fontella et al., 2002; Bridi et al., 2003). Além do dano oxidativo, ocorre a redução da homeostase energética pela inibição de importantes enzimas do metabolismo energético (Bridi et al., 2005; Pilla et al., 2003; de Franceschi et al., 2013), o que contribui para a disfunção neurológica da doença. O estudo do possível efeito protetor de uma terapia antioxidante na DXB pode levar a resultados promissores na terapêutica de portadores desta patologia. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo investigar os possíveis efeitos da administração crônica de leucina sobre a atividade de enzimas da rede de fosforiltransferência e sobre parâmetros de estresse oxidativo em córtex e hipocampo de ratos Wistar de 21 dias de vida. Além disso, investigamos o possível efeito preventivo da administração de creatina e piruvato e da administração de taurina sobre esses parâmetros.

O estresse oxidativo é causado por um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas e os antioxidantes, em favor da sua formação, causando o dano oxidativo

(Halliwell, 2013). O cérebro é particularmente vulnerável ao dano oxidativo devido à sua alta taxa de utilização de oxigênio, grande conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados e níveis moderados de defesas antioxidantes quando comparado a outros tecidos (Butterfield e Stadtman, 1997; Halliwell, 1996). O estresse oxidativo é considerado um evento importante relacionado com a patogênese de algumas doenças neurodegenerativas (Reznick e Packer, 1993; Halliwell e Gutteridge, 1985). Portanto, em ambos os trabalhos encontramos resultados semelhantes em relação aos parâmetros de estresse oxidativo causados pela administração crônica de leucina. Observamos que a administração de leucina causou um aumento na geração de espécies reativas através da oxidação do DCFH em córtex cerebral e hipocampo. A oxidação de lipídios foi determinada através dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), esta técnica reflete o conteúdo de malondialdeído (MDA), o produto mais abundante resultante da lipoperoxidação. O MDA pode prejudicar vários mecanismos fisiológicos devido a sua capacidade de reagir com as proteínas e com o DNA (Del Rio et al., 2005). Foi observado que a administração crônica de leucina aumentou os níveis de TBARS no córtex e hipocampo dos ratos, sugerindo que houve peroxidação lipídica. A concentração de grupos tiólicos reflete o estado redox da célula (Ying et al., 2007), os grupos tiólicos são fundamentais para manter a estrutura proteica e para que as proteínas desenvolvam suas funções catalíticas (Kim et al., 2000). A administração de leucina provocou aumento no conteúdo de sulfidrilas, esse aumento foi observado somente no hipocampo no primeiro trabalho e em ambas as estruturas, córtex e hipocampo, no segundo trabalho. O aumento nos níveis de tióis ocorre devido ao aumento das espécies reativas que reagem com a ligação dissulfeto (S-S) nas proteínas levando ao dano oxidativo (Stadtman e Levine, 2003). Além disso, considerando que um terço dos grupos sulfidrilas totais são encontrados na molécula de GSH, o aumento de tióis pode

ocorrer devido ao aumento na síntese de GSH, e o estresse oxidativo estimula a produção de GSH na célula (Lu, 2009). Com relação a esses parâmetros, a administração de creatina e piruvato no primeiro trabalho e a administração de taurina no segundo trabalho preveniram o aumento das espécies reativas e dos grupos sulfidrilas, e preveniram a lipoperoxidação. O conteúdo de GSH foi avaliado somente no segundo trabalho e observamos que a administração de leucina aumentou os níveis de glutathiona no córtex e hipocampo e a administração de taurina preveniu este aumento.

A atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx também foram avaliadas. A SOD é responsável pela remoção de ânions superóxidos através da dismutação do  $H_2O_2$ , e assim protege as células contra os efeitos nocivos deste radical livre (Marklund, 1985). E a GPx faz a remoção do  $H_2O_2$  e de outros peróxidos através da reação de oxidação da GSH (Leong et al., 1981). Em ambos os trabalhos, a administração de leucina diminuiu a atividade da GPx no córtex e no hipocampo e a atividade da SOD foi reduzida somente no córtex. Com relação à atividade da SOD no hipocampo, no primeiro trabalho não houve alteração na atividade e no segundo trabalho houve um aumento na atividade após a administração crônica de leucina. É possível que este aumento se deva a uma reação de compensação da célula devido à diminuição na atividade das enzimas. Portanto, a diminuição na atividade deste sistema antioxidante pode levar ao acúmulo de  $H_2O_2$  e de produtos da sua decomposição como o ânion superóxido (Diplock, 1994). O ânion superóxido é capaz de inibir a atividade da GPx (Macedo et al., 2013), assim como o  $H_2O_2$  pode inibir a atividade da SOD (Change et al., 1979). Além disso, os efeitos citotóxicos das espécies reativas de oxigênio podem ser causados pelo radical hidroxila ( $OH\cdot$ ) que é gerado a partir da reação de Fenton, o aumento deste radical pode inibir direta ou indiretamente a atividade das enzimas

antioxidantes (Halliwell, 2000). Com relação ao tratamento com os antioxidantes, observamos que a administração de creatina e piruvato no primeiro trabalho e a administração taurina no segundo trabalho foram capazes de prevenir estas alterações.

Considerando que em doenças neurodegenerativas ocorrem perturbações na distribuição e no fluxo energético das células (Ames, 2000), nós avaliamos a atividade de enzimas da rede de fosforiltransferência. Esta rede é formada por enzimas tiólicas que são responsáveis pela transferência de grupos fosforilas de alta energia entre os locais de produção e consumo de ATP, mantendo o equilíbrio energético na célula e contribuindo para a sua sobrevivência sobre condições de estresse (Wallimann et al., 1992; Dzeja e Terzic, 2003). As enzimas avaliadas foram: creatina cinase citosólica (CKcit), creatina cinase mitocondrial (CKmit), adenilato cinase (AK), piruvato cinase (PK), hexocinase (HK) e gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH).

O sistema creatina/fosfocreatina/creatina cinase (Cr/PCr/CK) é o maior sistema de transferência de grupos fosfato de alta energia nas células com alta demanda energética (Dzeja e Terzic, 2003), e desempenha uma importante função de manutenção dos altos níveis de energia necessários para o funcionamento do sistema nervoso central (SNC) (Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000). Uma diminuição na atividade da CK acarreta na redução dos níveis de creatina, reduzindo a eficiência da rede e a capacidade antioxidante da célula (Lawler et al., 2002). O sistema da AK cataliza a transferência reversível de grupos fosfato entre as moléculas de ATP e AMP da mitocôndria para o núcleo e citosol da célula, sendo assim a principal responsável pela rede de fosforiltransferência (Dzeja e Terzic, 2003; Price et al., 1975). A PK é uma importante enzima do metabolismo da glicose, catalisa a conversão irreversível do fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato, dando origem à molécula de ATP a partir do ADP. A deficiência de piruvato em consequência da inibição da atividade da PK pode induzir



a morte celular (Valentini et al., 2000). A GAPDH oxida o gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato, alterações na atividade desta enzima estão envolvidas em diversas doenças neurodegenerativas e neoplásicas, como no câncer de próstata, e nas doenças de Alzheimer, Huntington e Parkinson (Perrota et al., 2014). Os grupos fosfatos de alta energia gerados pelas enzimas glicolíticas, PK, HK e GAPDH podem ser usados para suprir algumas funções específicas na célula, como na manutenção do gradiente iônico de membrana e em processos nucleares (Ottaway e Mowbray, 1977; Masters et al., 1987).

O déficit no metabolismo energético do SNC tem um papel crítico na progressão de doenças neurológicas (Beal, 2000; Chaturvedi, 2008). Portanto, em ambos os trabalhos, observamos que todas as enzimas tiveram suas atividades diminuídas após a administração crônica de leucina no córtex e no hipocampo, exceto pela atividade da PK no córtex que não foi alterada no primeiro trabalho. Além disso, o tratamento com creatina e piruvato e o tratamento com taurina foram capazes de prevenir a inibição da atividade destas enzimas.

Quando a atividade de uma enzima da rede de fosforiltransferência diminui, esta pode ser compensada pelo aumento na atividade das outras enzimas para que não ocorra prejuízo energético à célula. Como exemplo, quando ocorre a inibição no transporte de grupos fosfatos de alta energia pelo sistema da AK, outra via alternativa é ativada, como o sistema da CK (Dzeja e Terzic, 2003; Wallimann et al., 1992; Neumann et al., 2003) ou quando ocorre um desequilíbrio em um local específico da cadeia glicolítica, este pode ser compensado em outro compartimento da célula (Goldbeter e Nicolis, 1976; Mair e Muller, 1996). No entanto, quando ocorre a diminuição na atividade de duas ou mais enzimas desta rede pode ocorrer uma alteração significativa na transferência de grupos fosfatos de alta energia entre os locais de geração e consumo de ATP (Dzeja et

al., 2000; Saks et al., 2006). Estas cinases contem um grupamento tiólico na sua estrutura, o que favorece o ataque de radicais livres levando à sua inativação. A atividade da CK pode ser inativada pelo ânion superóxido (Wendt et al., 2003) e a atividade da PK pode ser inativada pelo peróxido de hidrogênio (Halliwell e Gutteridge 2007). O acúmulo de outros aminoácidos podem induzir estresse oxidativo e levar a inibição destas enzimas pela oxidação dos grupamentos sulfidrilas, isto ocorre em modelos animais de erros inatos do metabolismo, como na cistinose (Feksa et al., 2004; Figueiredo et al., 2009), fenilcetonúria (Feksa et al., 2003; Costabeber et al., 2003), tirosinemia (de Andrade et al., 2012), beta-alaninemia (Gemelli et al., 2013), histidinemia (Rojas et al., 2012).

Os dados também foram analisados pela correlação de Spearman e encontramos os seguintes resultados: no primeiro trabalho houve uma correlação significativa entre a formação de espécies reativas através da oxidação do DCFH e a inibição das enzimas CK mit e CK cit, AK e PK no córtex e hipocampo, exceto para PK no córtex. Além disso, encontramos uma correlação entre o conteúdo de sulfidrilas totais e a inibição destas enzimas. Sendo assim, os resultados sugerem que a inibição na atividade das enzimas pode ocorrer através da ação das espécies reativas sobre o grupamento tiólico das enzimas. Portanto, é possível afirmar que a indução do estresse oxidativo, e a consequente alteração do equilíbrio energético, podem contribuir significativamente para o dano cerebral observado em pacientes com a DXB. E no segundo trabalho observamos uma correlação significativa entre a oxidação de DCFH, sulfidrilas totais e conteúdo de GSH, sugerindo que o aumento no conteúdo de sulfidrilas e de GSH pode ser uma resposta celular devido à indução do estresse oxidativo. Além disso, houve correlação significativa entre o conteúdo de sulfidrilas totais e as enzimas da rede de fosforiltransferência, sugerindo que a inibição da atividade destas enzimas pode ocorrer

devido a alteração no grupamento tiólico das enzimas causado pela ação dos radicais livres.

Antioxidantes são substâncias que em baixas concentrações atrasam, previnem ou removem o dano oxidativo, competindo com substratos oxidáveis e inibindo a sua oxidação (Halliwell e Gutteridge, 2010). Creatina, piruvato e taurina são importantes antioxidantes. A creatina além de possuir capacidade antioxidante direta (Lawler et al., 2002), também possui outros mecanismos de ação, atua como scavengers de radicais livres, faz a quelação de metais (Halliwell, 2001) e aumenta o conteúdo energético da célula (Persky e Brazeau., 2001). A suplementação de creatina tem sido eficaz em diversos modelos animais e modelos *in vitro* de doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington (Klein e Ferrante, 2007). O piruvato oferece proteção contra o estresse oxidativo e o dano mitocondrial, servindo de substrato para produção de ATP, uma vez que atua na síntese de acetil-coenzima A no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e possui propriedade antioxidantes como scavengers de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, protegendo as células do declínio energético e da apoptose (Andrae et al., 1985; Mukherjee et al., 1997, Vlassenko et al., 2006). A associação de creatina e piruvato tem mostrado efeito protetor contra o estresse oxidativo e previne o déficit energético em diversos trabalhos do nosso grupo de pesquisa (de Franceschi et al, 2012; Berti et al., 2012; de Andrade et al, 2015, 2017; Bortoluzzi et al., 2014). A taurina possui muitas funções, além de antioxidante, faz a detoxificação, modulação de neurotransmissores, estabilização de membrana, osmorregulação e modulação dos níveis de cálcio atuando na neuromodulação e neuroproteção, fazendo com que sirva de agente terapêutico para muitas doenças neurodegenerativas. A taurina atua como sequestradora de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Oliveira et al., 2010, Cunningham et al., 1998, Kocak-Tocker et al., 2005). A sua interação com o óxido

nítrico previne a geração de ânions superóxido na mitocôndria, o que evita a nitração e inativação de enzimas como a GAPDH e evita o dano a metaloproteínas (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Através da utilização de um modelo crônico de indução química da Doença do Xarope do Bordo em ratos Wistar, os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os dados anteriores da literatura demonstrando que o estresse oxidativo contribui para a disfunção neurológica observada na doença (Bridi et al., 2005; Scaini et al., 2012; Mescka et al., 2013). Creatina, piruvato e taurina atuaram de forma eficiente desempenhando a função de antioxidante/sequestradora neste modelo animal, prevenindo a ação de radicais livres que causam a oxidação de lipídios e a inativação de importantes enzimas da rede de fosforiltransferência e de enzimas detoxificadoras de espécies reativas. Estes resultados mostram que creatina, piruvato e taurina podem desempenhar um papel neuroprotetor como adjuvante na terapia de pacientes afetados pela DXB. Além disso, estes dados contribuem para a compreensão dos mecanismos responsáveis pela neurotoxicidade decorrente do acúmulo dos metabólitos envolvidos na doença.

## III.2 CONCLUSÕES

1 – Em ambos os trabalhos, a administração crônica de leucina induziu estresse oxidativo e diminuiu a atividade das enzimas da rede de fosforiltransferência, CK citosólica, CK mitocondrial, AK, PK, GAPDH e HK no córtex e no hipocampo, exceto pela atividade da PK no córtex que não foi alterada no primeiro trabalho. Os resultados indicam que a administração crônica de leucina pode estimular o estresse oxidativo e alterar o metabolismo energético em córtex cerebral e hipocampo de ratos;

2 – A coadministração de creatina e piruvato e de taurina foi eficaz na prevenção das alterações provocadas pela administração de leucina sobre o estresse oxidativo e as enzimas da rede de fosforiltransferência, sugerindo que estes antioxidantes podem ter um papel protetor no cérebro.

Portanto, através deste estudo, é possível concluir que o estresse oxidativo e a consequente inibição da atividade das enzimas da rede de fosforiltransferência podem contribuir para a fisiopatologia da disfunção cerebral encontrada na DXB. Os dados apresentados dão suporte à função de antioxidante/scavenger de creatina, piruvato e taurina, indicando um possível papel neuroprotetor e sugerindo que possam ser usados como adjuvantes na terapia dos pacientes com DXB. Estes resultados contribuem para o entendimento do mecanismo de ação dos efeitos citotóxicos da leucina acumulada na DXB e os efeitos dos antioxidantes neste processo.

### **III.3 PERSPECTIVAS**

1. Avaliar parâmetros de estresse oxidativo no plasma de ratos Wistar;
2. Avaliar parâmetros inflamatórios;
3. Avaliar o possível efeito protetor da norleucina;
4. Avaliar o quanto as alterações enzimáticas induzidas pela leucina se devem à inibição e o quanto se devem à alteração na síntese das mesmas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ames, A., III (2000). CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res Rev* 34:42-68.
- Anderson D, (1996). Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation research, Amsterdam* 350, 103-108.
- Andrae U, Singh J, Ziegler-Skylakakis K (1985). Pyruvate and related  $\alpha$ -ketoacids protect mammalian cells in culture against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *Toxicol let* 28:93-98
- Arouma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J, (1988). The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem J.* 256(1):251-5.
- Artuch R, Colome C, Vilaseca MA, Sierra C, Cambra FJ, lambruschini N, Campistol J, (2001). Plasma phenylalanine is associated with decreased sérum ubiquinone-10 concentrations in phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 24:359-366.
- Barschak AG , Sitta A, Deon M, Barden AT, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR (2008a). Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment. *Metab Brain Dis* 23:71-80.
- Barschak AG , Sitta A, Deon M, Busanello EN, Coelho DM, Cipriani F, Dutra-Filho CS, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR (2009) Amino acids levels and lipid peroxidation in maple syrup urine disease patients. *Clin Biochem* 42:462-466.
- Barschak AG , Sitta A, Deon M, de Oliveira MH, Haeser A, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR (2006). Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis* 21 279-286.
- Barschak AG, Marchesan C, Sitta A, Deon M, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR (2008b). Maple syrup urine disease in treated patients: biochemical and oxidative stress profiles. *Clin Biochem* 41:317-324.
- Beal MF. (2000) Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 23:298–304.
- Bender, A., Koch, W., Elstner, M., Schombacher, Y., Bender, J., Moeschl, M., Gekeler, F., Müller-Myhsok, B., Gasser, T., Tatsch, K., Klopstock, T., (2006). Creatine supplementation in Parkinson disease: a placebo controlled randomized pilot trial. *Neurology* 67, 1262–1264.
- Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M, (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life sciences* 65, 1865-1874.
- Berti SL, Nasi GM, Garcia C, Castro FL, Nunes ML, Rojas DB, Moraes TB, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM (2012). Pyruvate and creatine prevent oxidative stress and behavioral alterations caused by phenylalanine administration into hippocampus of rats. *Metab Brain Dis.* 27:79-89
- Bird S, Miller NJ, Collins JE, Rice-Evans A, (1995). Plasma antioxidant capacity in two cases of tirosinaemia type 1: one case treated with NTBC. *J inher Metab Dis* 18:123-126.

- Bolaños JP, Mor MA, Lizasoain I, Almeida A, (2009). Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: therapeutic implications. *Adv Drug Deliv Rev* 61,1299– 1315.
- Bortoluzzi VT, de Franceschi ID, Rieger E, Wannmacher CM (2014). Co-administration of creatine plus pyruvate prevents the effects of phenylalanine administration to female rats during pregnancy and lactation on enzymes activity of energy metabolism in cerebral cortex and hippocampus of the offspring. *Neurochem Res.* 39(8):1594-602.
- Bouckennooghe T, Remacle C, Reusens B, (2006). Is taurine a functional nutrient? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9(6):728-733.
- Boveris A, 1998. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina (B Aires)* 58(4):350-6
- Braughter JM, (2005). in *Oxygen Radicals and Tissue Injury* (Halliwell, B. ed.) pp.99-104, published for the Upjohn Co. by Federation of American Societies for Experimental Biology, Bathesda.
- Bridi R, Araldi J, Sgarbi MB, Testa CG, Durigon K, Wajner M, Dutra-Filho CS (2003). Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Int J Devl Neuroscience* 21:327-332.
- Bridi R, Latini A, Braun CA, Zorzi GK, Wajner M, Lissi EG, Dutra-Filho CS (2005). Evaluation of the mechanisms involved in leucine induced oxidative damage in cerebral cortex of young rats. *Free Radic Res* 39:71–79.
- Butterfield DA, Stadtman ER (1997). Protein oxidation processes in aging brain. *Adv cell aging gerontol.* 2:161-191.
- Change B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527-605
- Chaturvedi RK, Beal MF (2008). Mitochondrial approaches for neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* 1147:395-412. doi: 10.1196/annals.1427.027. Review
- Chesney RW, 1988. Taurine: is it required for infant nutrition? *J Nutr.* 118(1):6-10.
- Colome C, Slerra C, Vilaseca MA (2000). Congenital errors of metabolism: Cause of oxidative stress? *Med Clin* 115(3):111-117.
- Consler TG, Jennewein MJ, Cai GZ, Lee JC, (1992). Energetics of allosteric regulation in muscle pyruvate kinase. *Biochemistry*, 31, 7870-7878.
- Consler TG, Lee JC, (1988). Domain interaction in rabbit muscle pyruvate kinase. II. Small angle neutron scattering and computer simulation. *J Biol Chem.* 263, 2787-2793.
- Consler TG, Woodward SH, Lee JC, (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.
- Costabeber E, Kessler A, Severo Dutra-Filho C, de Souza Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM (2003). Hyperphenylalaninemia reduces creatine kinase activity in the cerebral cortex of rats. *Int J Dev Neurosci* 21:111-116
- Cozzi R, Ricordy R, Bartolini F, (1995). Taurine and ellagic acid: two differently-acting natural antioxidants. *Environ Mol Mutagen* 26:248-254.



- Cunningham C, Tipton KF, Dixon HB (1998). Conversion of taurine into N-chlorotaurine (taurine chloramine) and sulphoacetaldehyde in response to oxidative stress. *Biochem J* 330 (Pt 2):939-45.
- Dancis J, (1959). Phenylketonuria and maple sugar urine disease. *Bull NY Acad Med* 35:427-32.
- Dancis J, Hutzler J, Levitz M, (1960). Metabolism of the white blood cells in maple-syrup-urine disease. *Biochim Biophys Acta* 23:342-3.
- Da-Silva WS, Gómez-Puyou A, de Gómez-Puyou MT, Moreno-Sanchez R, De Felice FG, de Meis L, 2004. Mitochondrial Bound Hexokinase Activity as a Preventive Antioxidant Defense. *The Journal of Biological Chemistry* 279, (38)39846–39855.
- de Andrade RB, Gemelli T, Rojas DB, Bonorino NF, Costa BM, Funchal C, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM. (2015). Creatine and pyruvate prevent the alterations caused by tyrosine on parameters of oxidative stress and enzyme activities of phosphoryltransfer network in cerebral cortex of Wistar rats. *Mol Neurobiol.* 51(3):1184-94.
- de Andrade RB, Gemelli T, Rojas DB, Funchal C, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM (2012). Tyrosine impairs enzymes of energy metabolism in cerebral cortex of rats. *Mol Cell Biochem* 364:253–261
- de Andrade RB, Gemelli T, Rojas DB, Kim TDH, Zanatta Â, Schmitz F, Rodrigues AF, Wyse ATS, Wajner M, Dutra-Filho CS, Wannmacher CMD. (2017). Evaluation of Oxidative Stress Parameters and Energy Metabolism in Cerebral Cortex of Rats Subjected to Sarcosine Administration. *Mol Neurobiol.* 54(6):4496-4506.
- de Franceschi ID, Rieger E, Vargas AP, Rojas DB, Campos AG, Rech VC, Feksa LR, Wannmacher CM (2013). Effect of leucine administration to female rats during pregnancy and lactation on oxidative stress and enzymes activities of phosphoryltransfer network in cerebral cortex and hippocampus of the offspring. *Neurochem Res* 38:632-643.
- Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 15 316-328.
- Diplock AT (1994). Antioxidants and free radical scavenger. In: Rice-Evans CA, Burdon RH (eds) *Free radical damage and its control*, 1<sup>st</sup> edn. Elsevier, Amsterdam, pp 113-130.
- Dzeja P, Terzic A, (2009). Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. *Int J Mol Sci* 10, 1729-1772.
- Dzeja PP, 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.
- Dzeja PP, Redfield MM, Burnett JC, Terzic A (2000). Failing energetics in failing hearts. *Curr Cardiol rep* 2:212-217
- Dzeja PP, Terzic A (2003). Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J Exp Biol* 206:2039–2047.

- Dzeja PP, Vitkevicius KT, Redfield MM, Burnettm JC, Terzic A, (1999). Adenylate kinase -catalyzed phosphotransfer in the myocardium: increased contribution in heart failure. *Circ Res* 84, 1137–1143.
- Feksa LR, Cornelio A, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Wajner M, Wannmacher CM (2004). Inhibition of pyruvate kinase activity by cystine in brain cortex of rats. *Brain Res* 1012:93–100
- Feksa LR, Cornelio AR, Dutra-Filho CS, de Souza Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM (2003). Characterization of the inhibition of pyruvate kinase caused by phenylalanine and phenylpyruvate in rat brain cortex. *Brain Res* 968:199-205
- Fernstrom JD, 2005. Branched-chain amino acids and brain function. *The Journal of nutrition* 1539-1546.
- Figueiredo VC, Feksa LR, Wannmacher CM (2009). Cysteamine prevents inhibition of adenylate kinase caused by cysteine in rat brain cortex. *Metab Brain Dis* 24:373–381
- Fontella FU, Gassen E, Pulrolnik V, Wannmacher CM, Klein AB, Wajner M, Dutra-Filho CS (2002). Stimulation of lipid peroxidation in vitro in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis* 17(1):47-54.
- Fontella FU, Pulrolnik V, Gassen E, Wannmacher CMD, Klein AB, Wajner M, Dutra CS, (2000). Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. *Neuroreport* 11, 541-544.
- 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.
- 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.
- Gemelli T, de Andrade RB, Rojas DB, Bonorino NF, Mazzola PN, Tortorelli LS, Funchal C, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM (2013) Effect of  $\beta$ -alanine administration on selected parameters of oxidative stress and phosphoryltransfer network in cerebral cortex and cerebellum of rats. *Mol Cell biochem* 380:161-170
- Goldbeter, A. and Nicolis, G (1976). An allosteric enzyme model with positive feedback applied to glycolytic oscillations. *Progr Theor Biol* 4:65-160.
- Green TR, fellman JH, Eicher AL, Pratt KL, (1991). Antioxidant role and subcellular localization of hypotaurine and taurine in human neutrophils. *Biochem Biophys Acta* 1073:91-97.
- Halliwell B (1996). Free radicals, protein and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem Soc Trans* 24:1023-1027
- Halliwell B (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18:685–716
- Halliwell B (2013) The antioxidant paradox: less paradoxical now? *Br J Clin Pharmacol* 75:637-644.

- 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 JM. (1985). Oxygen radicals and nervous system. *Trends Neurosci*. 8:22-26.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2007). Free radical in biology and medicine. In: *Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death*, 4rd edn. Oxford University Press, Oxford, pp 32-64; 188-276.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2010). *Free Radicals in Biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford.
- Hersch SM, Gevorkian S, Marder K, Moskowitz C, Feigin A, Cox M, Como P, Zimmerman C, Lin M, Zhang L, Ulug AM, Beal MF, Matson W, Bogdanov M, Ebbel E, Zaleta A, Kaneko Y, Jenkins B, Hevelone N, Zhang H, Yu H, Schoenfeld D, Ferrante R, Rosas HD, (2006). Creatine in Huntington disease is safe, tolerable, bioavailable in brain and reduces serum 8OH2'dG. *Neurology* 66(2), 250-2.
- 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.
- Hotzman D, Tsuji M, Wallimman T, Hemmer W, (1993). Functional maturation of creatine kinase in rat brain. *Dev Neurosci* 15, 261-270.
- Huang, Y., Zielke, H.R., Tildon, J.T., Zielke, C.L., Baab, P.J, (1996). Elevation of amino acids in the interstitial space of the rat brain following infusion of large neutral amino and keto acids by microdialysis: leucine infusion. *Dev Neurosci* 18:415-419.
- Huxtable RJ, (1992). The physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 72, 101-163.
- Jagtap JC, Chandele A, Chopde BA, Shastry P, (2003). Sodium pyruvate protects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediated apoptosis in human neuroblastoma cell line-SK-N-MC. *J Chem Neuroanat* 26, 109– 118.
- Jardim LB, Martins CS, Pires RS, Sanseverino MT, Refosco L, Vieira RC; Trotta EA; Vargas CR; Neto EC; Giugliani R, (1995). Uma experiência terapêutica no manejo da doença da urina do xarope do bordo. *Jornal de Pediatria*. 71:279-284.
- Kaneko M, Masuda H, Suzuki H, Matsumoto Y, Kobayashi A, Yamazaki N, (1993). Modification of contractile proteins by oxygen free radicals in rat heart. *Mol Cell Biochem*. 125, 163-169.
- Killic F, Bhardwaj R, Caulfeild J, Trevithick JR, (1999). Modelling cortical cataractogenesis 22: is in vitro reduction of damage in model diabetic rat cataract by taurine due to its antioxidant activity? *Exp Eye res*. 69(3):291-300.
- Kim JR, Yoon HW, Kwon KS, Lee SR, Rhee SG (2000) Identification of proteins containing cysteine residues that are sensitive to oxidation by hydrogen peroxide at neutral pH. *Anal Biochem* 283:214-221.
- Klein AM, Ferrante RJ (2007) The neuroprotective role of creatine. *Subcell Biochem* 46:205-243

- Knerr I, Weinhold N, Vockley J, K. Michael Gibson K (2012). Advances and challenges in the treatment of branched-chain amino/keto acid metabolic defects. *J Inherit Metab Dis* 35:29–40.
- Kocak-Toker N, Giris M, Tülübas F, Uysal M, Aykac-Toker G (2005). Peroxynitrite induced decrease in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity is restored by taurine. *World J Gastroenterol* 11(23):3554-7.
- Kozumbo WJ, Agarwal S, Koren HS, (1992). Breakage and binding of DNA by reaction products of hypochlorous acid with aniline, 1-naphthylamine or 1-naphthol. *Toxicol Appl Pharmacol.* 115, 107-115.
- Latini A, Scussiato K, Leipnitz G, Dutra-Filho CS, Wajner M, (2005). Promotion of oxidative stress by 3-hydroxyglutaric acid in rat striatum. *J Inherit Metab Dis* 28: 57-67.
- Lawler JM, Barnes WS, Wu G, Song W, Demaree S (2002) Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun* 290:47–52
- 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.
- Lu SC (2009) Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 30(1-2):42-59. doi: 10.1016/j.mam.2008.05.005. Review
- Macedo LGRP, Carvalho-Silva M, Ferreira GK, Vieira JS, Olegário N, Gonçalves RC, Vuolo FS, Ferreira GC, Schuck PF, Dal-Pizzol F, Streck EL (2013) Effect of acute administration of L-tyrosine on oxidative stress parameters in brain of Young rats. *Neurochem Res* 38:2625-2630
- Mair T. and Muller SC (1996) Traveling NADH and proton waves during oscillatory glycolysis in vitro. *J Biol Chem* 271, 627-630.
- Marklund SL (1985) Pyrogallol autoxidation. In: Greenwald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research*, CRC Press Inc, Boca Raton, pp 243–247.
- Marks AD, Smith C, Lieberman M. *Bioquímica médica de Marks*, Porto Alegre, Artmed, 2<sup>o</sup>ed, 2007.
- Masters CJ, Reid S, Don M (1987) Glycolysis – new concepts in an old pathway. *Mol Cell Biochem* 76, 3-14.
- Matson W, Bogdanov M, Ebbel E, Zaleta A, Kaneko Y, Jenkins B, Hevelone N, Zhan H, Yu H, Schoenfeld D, Ferrante R, Rosas HD, (2006). Creatine in Huntington disease is safe, tolerable, bioavailable in brain and reduces serum 8OH<sup>2</sup>dG. *Neurology* 66, 250–252.
- Maus M, Marin P, Israel M, Glowinski J, Premont J, (1999). Pyruvate and lactate protect striatal neurons against N-methyl-Daspartate-induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci* 11(9), 3215–3224.
- Mazzio E, Soliman KFA, (2003). Pyruvic acid cytoprotection against 1-methyl -4-phenylpyridinium, 6-hydroxydopamine and hydrogen peroxide toxicities in vitro. *Neurosci Lett* 337, 77– 80.
- McLeish MJ, Kenyon GL, (2005). Relating Structure to Mechanism in Creatine Kinase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 40, 1-20. *Med Invest* 52, 127-136.

- Menkes JH, Hurst PL, Craig JM, (1954). A new syndrome: Progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics*.14:462.
- Mescka CP, Wayhs CA, Vanzin CS (2013) Protein and lipid damage in maple syrup urine disease patients: l-carnitine effect. *Int J Dev Neurosci* 31:21–24.
- Mescka CP, Wayhs CA, Vanzin CS (2013) Protein and lipid damage in maple syrup urine disease patients: l-carnitine effect. *Int J Dev Neurosci* 31:21–24.
- Morton DH, Strauss KA, Robinson DL, et al (2002). Diagnosis and treatment of maple syrup disease: a study of 36 patients. *Pediatrics* 109:999-1008.
- Muelly ER; Moore GJ, Bunce SC, Mack J, Bigler DC, Morton DH, Strauss KA, (2013). Biochemical correlates of neuropsychiatric illness in maple syrup urine disease. *J. Clin. Invest.* 123:1809-20.
- Mukherjee SK, Klaidman LK, Yasharel R, Adams JD (1997) Increased brain NAD prevents neuronal apoptosis in vivo. *Eur J Pharmacol* 330:27–34
- Neumann, D., Schlattner, U. and Wallimann, T (2003) A molecular approach to the concerted action of kinases involved in energy homeostasis. *Biochem Soc Trans* 31, 169-174.
- Noma T, (2005). Dynamics of nucleotide metabolism as a supporter of life phenomena. *J.*
- Oberfelder RW, Barisas BG, Lee JC, 1984. Thermodynamic linkages in rabbit muscle pyruvate kinase: kinetic, equilibrium, and structural studies. *Biochemistry* 23, 3813-3821.
- Oliveira MW, Minotto JB, de Oliveira MR, Zanotto-Filho A, Behr GA, Rocha RF, Moreira JC, Klamt F (2010) Scavenging and antioxidant potential of physiological taurine concentrations against different reactive oxygen/nitrogen species. *Pharmacol Rep* 62:185-93
- Oskam R, Van Els CA, Rijksen G, Staal GE, (1985). Pyruvate kinase isozymes and Ottaway JH and Mowbray J (1977). The role of compartmentation in the control of glycolysis. *Curr Top Cell Reg* 12, 107-208.
- Panten U, Krigstein WV, Poser W, Schonborn J, Hasselblatt A, 1972. Effects of L-leucine and  $\alpha$ -ketoisocaproic acid upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets. *FEBS let* 20:225-228.
- Peinemann F, Danner, DJ, (1994). Maple syrup urine disease 1954-1993 *J Inherit metab Dis* 17:3-15.
- Perrotta I, Aquila S, Mazzulla S (2014) Expression Profile and Subcellular Localization of GAPDH in the Smooth Muscle Cells of Human Atherosclerotic Plaque: An Immunohistochemical and Ultrastructural Study with Biological Therapeutic Perspectives. *Microsc Microanal* 20:1145–57.
- Persky AM, Brazeau GA (2001) Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. *Pharmacol Rev.* 53(2):161-76.
- Pilla C, Cardozo RFO, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Wajner M, Wannmacher CM (2003) Effect of leucine administration on creatine kinase activity in rat brain. *Metab Brain Dis* 18:17-25.

- Price NC, Cohn M, Schirmer RH (1975) Fluorescent and spin label probes of the environments of the sulfhydryl groups of porcine muscle adenylate kinase. *J Biol Chem* 250:644–652
- Reznick AZ, Packer L, (1993). Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. In: Poli G, Albano E, Dianzani MU (Eds). *Free Radicals: from Basic Science to medicine*. Basel: Birkhauser Verlag, pp. 425-437.
- Ribeiro CA, Sgaravatti AM, Rosa RB, Schuck PF, Grando V, Schmidt AL, Ferreira GC, Perry ML, Dutra-Filho CS, Wajner M (2008) Inhibition of brain energy metabolism by the branched-chain amino acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem Res* 33:114–124.
- Rojas DB, de Andrade RB, Gemelli T, Oliveira LS, Campos AG, Dutra-Filho CS, Wannmacher CMD (2012). Effect of histidine administration to female rats during pregnancy and lactation on enzymes activity of phosphoryltransfer network in cerebral cortex and hippocampus of the offspring. *Metab Brain Dis.* 27(4):595-603.
- Saks V, Dzeja P, Schlattner U, Vendelin M, Terzic A, Wallimann T (2006) Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-Starling law. *J Physiol* 571:253–273
- Scaini G, Jeremias IC, Morais MO, Borges GD, Munhoz BP, Leffa DD, Andrade VM, Schuck PF, Ferreira GC, Streck EL. (2012) DNA damage in an animal model of maple syrup urine disease. *Mol Genet Metab* 106:169-174.
- Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (2001). 8a ed. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. New York: MacGraw-Hill.
- Serra, JD, Sánchez, FA, Visus, FSD, (2010). Enfermedades de orina de jarabe arce. In: Saunjurjo, P.; Baldellou, A. *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias*. Madrid: Ediciones Ergon, p 487-498.
- Sestili P, Martinelli C, Bravi G, Piccoli G, Curci R, Battistelli M, Falcieri E, Agostini D, Gioacchini AM, Stocchi V, (2006). Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med*, 40, 837–849.
- Shami NJE, Moreira EAM, (2004). Licopeno como agente antioxidante. *Nutrition* 17, 227-36.
- 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.
- Simon E, Finferhut R, Baukötter J, Konstantopoulou V, Wendel U, (2006). Maple Syrup Urine Disease: favorable effect of early diagnosis by newborn screening on the neonatal course of the disease. *J Inher Metab Disease.* 29 (4):532-537.
- Stadtman ER, Levine RL (2003) Free-radical mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25:207–218
- Strauss KA, Puffenberger EG, Robinson DL, Morton DH, (2003). Type I glutaric aciduria, part 1: Natural history of 77 patients. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 121C(1):38-52.

- Strauss KA, Wardley B, Robinson D, Hendrickson C, Rider NL, Puffenberger EG, Shellmer D, Moser AB, Morton DH, (2010). Classical maple syrup urine disease and brain development: principles of management and formula design. *Mol Genet Metab.* 99:333-45.
- Streck EL, Vieira PS, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wyse AT, (2003). In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. *Metab Brain Dis* 18: 147-154.
- Sturman, JA, (1993). Taurine in development. *Physiol Rev* 73, 119-148.
- Sukuki YJ, Edmondson JD, Ford GD, (1992). Inactivation of rabbit muscle creatine kinase by hydrogen peroxide. *Free Radicals Res Commun*, 16, 131-136.
- Tarnopolsky MA, (2007). Clinical use of creatine in neuromuscular and neurometabolic disorders. *Subcell Biochem* 46, 183– 204.
- Valentini G, Chiarelli LR, Fortin R, Speranza ML, Galizzi A, Mattevi A (2000) The allosteric regulation of pyruvate kinase. *J Biol Chem* 275:18145–18152
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J, (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(1):44-84.
- Vlassenko AG, Rundle MM, Raichle ME, Mintun MA (2006) Regulation of blood flow in activated human brain by cytosolic NADH/NAD ratio. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1964–1969
- Wallimann T, Dolder M, Schlattner U, Eder M, Hornemann T, Kraft T, Stolz M, (1998). Creatine kinase: an enzyme with a central role in cellular energy metabolism. *Magma* 6, 116–119.
- 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. *Biochem J* 281:21-40
- Walsh KS; Scott MN, (2010). Neurocognitive profile in a case of maple syrup urine disease. *Clin Neuropsychol.* 24:689-700.
- Wang JX, Li Y, Zhang LK, Zhao J, Pang YZ, Tang CS, Zhang J, (2005). Taurine inhibits ischemia/reperfusion-induced compartment syndrome in rabbits. *Acta Pharmacol Sin.* 26(7):821-827.
- Wendt S, Schlattner U, Wallimann T (2003). Differential effects of peroxynitrite on human mitochondrial creatine kinase isoenzymes. *J Biol Chem* 278:1125–1130
- Whittingham TS, Lipton, P, (1981). Cerebral synaptic transmission during anoxia is protected by creatine. *J Neurochem.* 37, 1618-1621.
- Wyss M, Kaddurah-Daouk R (2000) Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 80:1107–1213
- Wyss M, Schulze A, (2002). Health Implications Of Creatine: Can Oral Creatine Supplementation Protect Against Neurological And Atherosclerotic Disease? *Neuroscience.* 112, 243-260.

Ying J, Clavreul N, Sethuraman M, Adachi T, Cohen RA (2007) Thiol oxidation in signaling and response to stress: detection and quantification of physiological and pathophysiological thiol modifications. *Free Radic Biol Med* 43:1099-1101.

Yuwiler A., Geller E, (1965). Serotonina depletion by dietary leucine. *Nature* 208:83-84, 1965.