



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Estudos experimentais sobre parâmetros do metabolismo energético e de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos submetidos ao modelo químico de sarcosinemia

Rodrigo Binkowski de Andrade

Orientador: Prof. Dr. Clovis Milton Duval Wannmacher

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:

Bioquímica como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre, 2016

CIP - Catalogação na Publicação

Binkowski de Andrade, Rodrigo

Estudos experimentais sobre parâmetros do metabolismo energético e de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos submetidos ao modelo químico de sarcosinemia / Rodrigo Binkowski de Andrade. -- 2016.

115 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, 2016.

1. Sarcosinemia. 2. Doença Metabólica. 3. Modelo Animal. 4. Sarcosina. I. Milton Duval Wannmacher, Clovis, orient. II. Título.

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida. Aos meus pais, Rosane e Luiz Fernando; Bruna e Fernando, meus irmãos; Marianna, minha namorada e aos meus amigos próximos.

“Se você encontrar um caminho sem obstáculos, ele provavelmente não leva a lugar nenhum.” – Frank Clark

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer ao meu mestre dos magos, Clovinho, pela compreensão e os ensinamentos incomparáveis que tive nessa última década. Tu não és somente meu orientador, és meu amigo (quase um avô, hahaha), te admiro e me inspiro para ser uma pessoa tão sábia e generosa quanto tu és. Ok, baby?

Aos professores do grupo de erros inatos do metabolismo da bioquímica da UFRGS, Ângela, Moacir e Dutra pelas sugestões e parcerias realizadas;

Aos amigos e colegas: Itiane, Elenara, Éder, Vanessa, Vivian, Elissa, Tomas e Juliano por tudo que fizeram ou ainda fazem no laboratório;

A Tanise, amiga de toda a vida, que me ajudou muito nos experimentos e fora do laboratório;

Aos meus sobrinhos do coração, Gui e Sofia!

A Deni que me ajudou em todos os experimentos e foi fundamental para minha tese de doutorado pudesse ser concluída;

Ao doutor Thales (finalmente) pela boa convivência e aos nossos ensaios musicais.

Ao Mauricio Bassuino, grande amigo que fiz na FSG e para a vida. Valeu, patrãozinho!

Aos colegas do grupo de erros inatos do metabolismo, laboratórios 34 D, 36 e 38 pelo auxílio constante nos experimentos e discussões durante os 10 anos que estive no Departamento de Bioquímica da UFRGS;

Ao meu pai, mãe, Bruna, Feko e amigos (Thiago Secco, Athos, Marramon, Alexandre Luz de Castro e Rodolfo) que me apoiaram imensamente e me deram força para ir em frente;

Ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida e a UFRGS pela excelência no ensino;

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, principalmente a Cléia;

Agradeço imensamente aos meus alunos de Caxias do Sul, especialmente o João (mineiro);

Agradeço aos meus enteados, Pedro e Marco, por me acolherem e terem uma convivência ótima comigo;

Por fim, agradeço a minha namorada Marianna que foi o maior presente que ganhei nos últimos tempos na minha vida. Obrigado por me incentivar e estar ao meu lado. Te amo!

Obrigado, pessoal!

SUMÁRIO

Parte I.....	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
I.1 – INTRODUÇÃO.....	7
I.1.1– Erros Inatos do Metabolismo.....	7
I.1.1.2 –Sarcosinemia.....	8
I.1.2– Sarcosina.....	9
I.1.2.1– Formação da sarcosina a partir da glicina.....	10
I.1.2.2– Transporte transmembrana da sarcosina.....	11
I.1.2.3– Dados laboratoriais de pacientes com sarcosinemia.....	12
I.1.3 – Metabolismo energético.....	13
I.1.3.1 - Rede de fosforiltransferência.....	13
I.1.3.1.1 –Creatina cinase.....	15
I.1.3.1.2 – Adenilato cinase.....	21
I.1.3.1.3 – Piruvato cinase.....	22
I.1.3.1.4 – Hexocinase.....	23

I.1.3.1.5 – Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase.....	24
I.1.3.2 – Complexos respiratórios e a fosforilação oxidativa.....	25
I.1.4 – Bomba Na ⁺ /K ⁺ /ATPase.....	26
I.1.5 – Espécies reativas.....	27
I.1.5.1 – Estresse oxidativo.....	29
I.1.6 – Sistemas antioxidantes.....	30
I.1.6.1 – Creatina.....	32
I.1.6.2 – Piruvato.....	33
2. OBJETIVOS.....	35
I.2.1. Objetivo geral.....	35
I.2.2. Objetivos específicos.....	35
<i>Parte II.....</i>	36
II. CAPÍTULO I – Artigo 1.....	37
II. CAPÍTULO – Artigo 2.....	55
<i>Parte III.....</i>	87
III. 1. DISCUSSÃO.....	88
III.2. CONCLUSÕES.....	97
III. 3. PERSPECTIVAS	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

PARTE I
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

RESUMO

Sarcosina é um N-metil-aminoácido derivado da glicina e a sua elevação em tecidos e fluidos fisiológicos de pacientes com sarcosinemia pode refletir na quantidade de unidades de um carbono. A sarcosinemia é uma condição metabólica rara, de natureza hereditária, associada a um possível retardo mental. Primeiramente, desenvolvemos um modelo agudo induzido quimicamente de sarcosinemia em ratos Wistar. Os ratos de 7, 14 e 21 dias de idade pós-parto receberam sarcosina intraperitonealmente em doses de 0,5 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal três vezes por dia em intervalos de 3 h. Os animais do grupo controle receberam solução salina (NaCl a 0,85 g%) no mesmo volume (10 $\mu\text{l/kg}$ de peso corporal). Eles foram mortos após 0,5, 1, 2, 3 ou 6 horas depois da última injeção e o cérebro e o sangue foram coletados para a dosagem da sarcosina. Os resultados mostraram que as concentrações plasmáticas e cerebrais de sarcosina atingiram níveis de três a quatro vezes mais elevados do que os níveis normais. Além disso, esses níveis diminuíram ao longo do tempo, atingindo a normalidade após 6 horas. Em um segundo momento, investigamos a administração aguda da sarcosina e/ou creatina mais piruvato sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo energético em homogeneizados de córtex cerebral de ratos Wistar com 21 dias de idade. A administração aguda de sarcosina induziu o estresse oxidativo e diminuiu as atividades da adenilato cinase (AK), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), atividade do complexo IV e CK citosólica e mitocondrial. Por outro lado, a atividade da succinato desidrogenase (SDH) foi aumentada em córtex cerebral de ratos. Além disso, o conteúdo total de sulfidrilas foi significativamente reduzido, enquanto a oxidação do DCFH, níveis de TBARS e as atividades da superóxido dismutase (SOD) e glutatona-peroxidase (GPx) foram significativamente aumentadas por essa administração. A co-administração de creatina mais piruvato foi eficaz na prevenção de alterações provocadas pela administração de sarcosina sobre o estresse oxidativo e as enzimas da rede de fosforiltransferência. Esses resultados indicam que a administração aguda de sarcosina pode estimular o estresse oxidativo e alterar o metabolismo energético em córtex cerebral de ratos. No caso de esses efeitos também ocorrerem em humanos, eles podem contribuir, juntamente com outros mecanismos, para a disfunção neurológica de sarcosinemia sendo que a administração de creatina mais piruvato poderia ser benéfica para os pacientes.

ABSTRACT

Sarcosine is an N-methyl derivative of the amino acid glycine, and its elevation in tissues and physiological fluids of patients with sarcosinemia could reflect a deficient pool size of activated 1-carbon units. Sarcosinemia is a rare inherited metabolic condition associated with mental retardation. Firstly, we developed an acute chemically induced model of sarcosinemia in Wistar rats. Wistar rats of 7, 14 and 21 postpartum days received sarcosine intraperitoneally in doses of 0.5 $\mu\text{mol/g}$ of body weight three times a day at intervals of 3 hours. Control animals received saline solution (NaCl 0.85 g%) in the same volume (10 ml/kg of body weight). The animals were killed after 0.5, 1, 2, 3 or 6 h after the last injection and the brain and the blood were collected for sarcosine measurement. The results showed that plasma and brain sarcosine concentrations achieved levels three to four times higher than the normal levels and decreased in a time-dependent way, achieving normal levels after 6 hours. In a second moment, we investigated the acute effect of sarcosine and/or creatine plus pyruvate on some parameters of oxidative stress and energy metabolism in cerebral cortex homogenates of 21-day-old Wistar rats. Acute administration of sarcosine induced oxidative stress and diminished the activities of adenylate kinase, GAPDH, complex IV and mitochondrial and cytosolic creatine kinase. On the other hand, succinate dehydrogenase activity was enhanced in cerebral cortex of rats. Moreover, total sulfhydryls content was significantly diminished, while DCFH oxidation, TBARS content, and activities of SOD and GPx were significantly enhanced by acute administration of sarcosine. Co-administration of creatine plus pyruvate was effective in the prevention of alterations provoked by sarcosine administration on the oxidative stress and the enzymes of phosphoryltransfer network. These results indicate that acute administration of sarcosine may stimulate oxidative stress and alter the energy metabolism in cerebral cortex of rats. In case these effects also occur in humans, they may contribute, along with other mechanisms, to the neurological dysfunction of sarcosinemia. Creatine and pyruvate administration could be beneficial to the patients.

LISTA DE ABREVIATURAS

AK – adenilato cinase

ADP – trifosfato de adenosina

AMP – monofosfato de adenosina

ANT - translocador adenina nucleotídeo

CAT – catalase

Cr- creatina

CK-MM – creatina cinase citosólica isoforma muscular

CK-BB – creatina cinase citosólica isoforma cerebral

CK-MB – creatina cinase citosólica heterodímero cardíaca

CK-Miu – creatina cinase mitocondrial forma ubíqua

CK-Mis – creatina cinase mitocondrial forma sarcomérica

Complexo I - NADH desidrogenase

Complexo II - succinato: ubiquinona oxirredutase

Complexo III - complexo citocromo b-c1

Complexo IV - citocromo c oxidase

CuZnSOD - cobre-zinco superóxido dismutase

CK-Mi – creatina cinase mitocondrial

CK-Ci – creatina cinase citosólica

CK – creatina cinase

EIM – Erros Inatos do Metabolismo

ERO - espécies reativas de oxigênio

ERON - espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

FAD - flavina adenina dinucleotídeo (forma oxidada)

FADH₂ - flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

FBP - frutose-1,6-bifosfato

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GPx - glutatona peroxidase

GTP – trifosfato de guanosina

GDP – difosfato de guanosina

GSH – glutatona reduzida

HK – hexocinase

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

K_m – constante de Michaelis

K_i – constante de inibição

kDa – quilodalton

MnSOD - manganês superóxido dismutase

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

Na⁺, K⁺- ATPase – bomba sódio/potássio ATPase

NMDA- receptor ionotrópico ativado pelo ácido glutâmico /Aspartato

O₂ – oxigênio molecular

OH• - radical hidroxil

O₂^{•-} - radical ânion superóxido

OONO⁻ - peroxinitrito

PCr – fosfocreatina

PEP – fosfoenolpiruvato

Pi – fosfato inorgânico

PK – piruvato cinase

SLC6A8 - transportador de creatina

SNC – sistema nervoso central

RNAm - RNA mensageiro

VDAC - canal aniônico dependente de voltagem

I.1 – INTRODUÇÃO

I. 1.1 – Erros Inatos do Metabolismo

A primeira menção aos erros inatos do metabolismo (EIM) ocorreu em 1908, quando Sir Archibald Garrod usou esse termo para designar doenças como a alcaptonúria, patologia na qual os pacientes afetados excretam grandes quantidades do ácido homogentísico na urina (Scriver et al, 2001). Garrod observou uma maior frequência dessa alteração em indivíduos de uma mesma família e maior incidência de consanguinidade entre os pais dos pacientes afetados. Sabendo disso, e baseado nas leis de Mendel, Garrod propôs um modelo de herança autossômica recessiva para esse distúrbio. Através da observação do ácido homogentísico, excretado em altas concentrações na urina dos pacientes com alcaptonúria, ele relacionou esse distúrbio com um bloqueio na rota do catabolismo da tirosina (Scriver et al, 2001).

Com o surgimento de novos distúrbios relacionados a alterações genéticas e que envolviam o acúmulo de outras substâncias nos líquidos biológicos dos pacientes, postulou-se que essas doenças resultavam da síntese qualitativa ou quantitativamente anormal de uma proteína, enzimática ou não, pertencente ao metabolismo (Scriver et al, 2001). Portanto, em consequência desse bloqueio metabólico, pode ocorrer o acúmulo de precursores da reação catalisada pela enzima envolvida, com a formação de rotas metabólicas alternativas e a deficiência de produtos essenciais ao organismo (Bickel, 1987).

Desde o estudo inicial de Garrod, o conhecimento dessas doenças metabólicas tem crescido exponencialmente. Os EIM envolvem alterações nos processos de síntese, degradação,

transporte e armazenamento de moléculas no organismo, causando um grande número de defeitos, com quadros clínicos diversos, que podem ser desde assintomáticos até tão graves que causem morte neonatal (Benson e Fenson, 1985).

Os EIM manifestam-se geralmente na infância, manifestando sinais e sintomas associados a estas condições são encontradas em doenças infantis (Holtzman, 1978). Apesar de raros quando considerados individualmente, os EIM são relativamente frequentes em seu conjunto, podendo ocorrer aproximadamente um em cada mil recém-nascidos vivos. As técnicas de investigação bioquímica têm colaborado para a descoberta de novos erros inatos do metabolismo, esclarecendo cada vez mais os já conhecidos (Fouchard et al, 2016).

I.1.1.2 –Sarcosinemia

A formação e degradação de sarcosina ocorrem no fígado e rim. A sarcosina é formada enzimaticamente a partir de dimetilglicina pela dimetilglicina desidrogenase (E.C. 1.5.99.2) e convertida à glicina pela sarcosina desidrogenase (E.C. 1.5.99.1). A sarcosinemia é um fenótipo caracterizado pela concentração aumentada de sarcosina (N-metilglicina) no plasma e excreção aumentada de sarcosina na urina. Ocorre por causa de um defeito na conversão de sarcosina à glicina que é catalisada pela sarcosina desidrogenase. Uma deficiência da sarcosina desidrogenase pode ocorrer devido a uma alteração genética na apoenzima, disfunção de uma flavoproteína transferidora de elétron ou uma severa deficiência grave de ácido fólico. Uma pequena fração de sarcosina pode ser gerada a partir de glicina pela enzima glicina-N-metiltransferase (E.C. 2.1.1.20) (Scriver et al, 2001).

Os pacientes com sarcosinemia foram originalmente relatados com retardo mental ou problemas neurológicos, no entanto, existem dúvidas em relação sobre os sintomas manifestados. A sarcosinemia que ocorre a partir da deficiência da atividade da sarcosina desidrogenase é herdada e apresenta uma condição autossômica recessiva. A incidência global encontrada em programas de rastreamento na urina de recém-nascidos é de 1/350.000. O gene da sarcosina desidrogenase humana foi clonado e está localizado no cromossomo 9q34 (Scriver et al, 2001).

I.1.2– Sarcosina

A sarcosina é um aminoácido que tem um papel importante no metabolismo intermediário, principalmente no metabolismo de um carbono. Quimicamente, a sarcosina (N-metilglicina) é uma molécula de glicina que é modificada pela adição de um grupo metil ligado ao átomo de nitrogênio. A N-metilglicina é indetectável em fluidos biológicos e não compõem as proteínas de mamíferos. O processo de síntese e degradação da sarcosina é iniciada pela desmetilação da dimetilglicina, posteriormente, a ação das enzimas sarcosina desidrogenase e serina hidroximetilase produz a glicina e serina, respectivamente (Figura 1). A ação dessas enzimas em conjunto produz fragmentos de um carbono ativos, os quais reagem com o tetrahydrofolato para formar o N5, N10-metilenotetrahydrofolato (Scriver et al, 200; Mallorga et al. 2003).

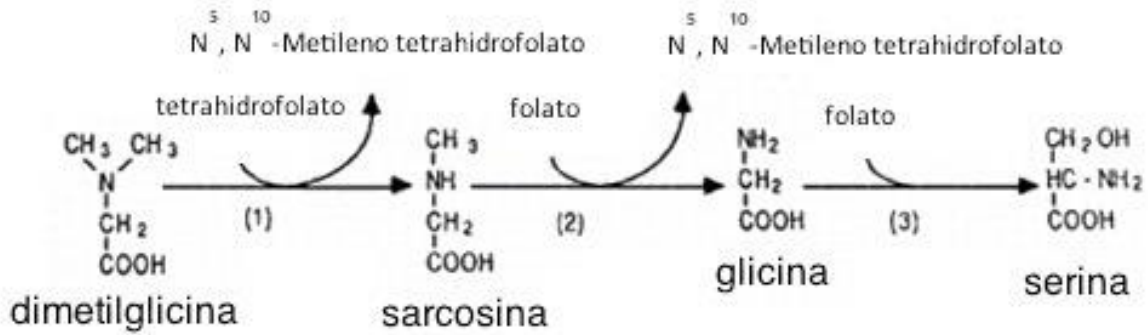


Figura 1 - Síntese e degradação da sarcosina. *Adaptado de Scriver et al., 2001.*

As reações que sintetizam a sarcosina e glicina ocorrem dentro das mitocôndrias e requerem folato como cofator enzimático (Scriver et al, 2001). Além disso, A N-metilglicina pode ser sintetizada a partir da S-adenosilmetionina (SAM) e glicina, produzindo sarcosina e S-adenosilhomocisteína (Zhang et al. 2009).

Os efeitos sobre pacientes que tomaram 2 g de sarcosina por dia, apresentaram melhoras nos sintomas da esquizofrenia. Esse mecanismo da sarcosina provavelmente foi evidenciado por causa da sua inibição dos transportadores de glicina tipo 1, no qual aumento os níveis de glicina na fenda sináptica e aumenta a probabilidade de ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (Mallorga et al. 2003).

I.1.2.1– Formação da sarcosina a partir da glicina

Um mecanismo alternativo para a formação da sarcosina foi proposto (Mitchell e Benevenga, 1978). A mensuração do carbono da metionina na sarcosina e serina indica que 5-

14% da 1-metil- metionina [C^{14}] na dieta dos seres humanos é transformada em sarcosina. Nessa reação, a metionina é convertida em S-adenosilmetionina e esse composto reage com a glicina para formar a sarcosina e a S-adenosilhomocisteína. A enzima para essa reação é glicina-N-metiltransferase. Ela está presente no fígado, rim, pâncreas de coelhos e ratos (Kerr, 1972; Heady, 1973).

Postula-se que a glicina-N-metiltransferase desempenha a remoção do excesso fisiológico de grupos de metil (a partir de S-adenosilmetionina) pela formação da glicina. Esta é a principal enzima de ligação de folato em fígado de rato, cuja sua atividade é aumentada pela fosforilação de uma proteína cinase e inibido quando é acoplado com ligante de folato, 5-metiltetrahydropterol pentaglutamato (Wagner, Decha-Umphai e Corbin, 1989). Esse passo regulador na formação da sarcosina é importante na taxa de conversão de S-adenosilmetionina para S-adenosilhomocisteína. A existência dessa via em seres humanos ainda não foi confirmada.

I.1.2.2– Transporte transmembrana da sarcosina

O mecanismo pelo qual a sarcosina é transportada através das membranas celulares está se tornando cada vez mais compreendida. O sistema transportador de glicina humano (GlyT-1) tem um K_m de 80 a 90 mM e está inibida competitivamente por sarcosina de forma semelhante ($K_i = 80$ a 90 mM). Assim, é provável que sarcosina e glicina possam compartilhar esse mesmo sistema para o transporte (Liu, 1993).

GlyT-1 é expresso em grande quantidade no cérebro e rim de humanos; GlyT-1c, de uma isoforma GlyT-1, só é expressa no cérebro, enquanto que GlyT-1a é aparentemente o único subtipo expresso no tecido periférico. Um transportador semelhante a glicina (TGli-2) também foi clonado, sequenciado e expresso. O GlyT-2 é especificamente localizada medula espinhal, tronco cerebral e cerebelo, mas ao contrário do GlyT-1, não mostra inibição por sarcosina (Liu, 1993). Não há nenhuma evidência de que esse sistema esteja envolvido no transporte sarcosina. Assim, é plausível que alguns pacientes com elevados níveis de sarcosina cerebral ou no líquido pode ter inibição do sistema do GlyT-1 que regula o rápido fluxo de concentrações de glicina envolvidos na neurotransmissão (Herdon et al. 2001).

I.1.2.3– Dados laboratoriais de pacientes com sarcosinemia

Sarcosina normalmente não é detectável no plasma ou na urina. Em pacientes com sarcosinemia, a concentração no sangue varia entre 53 μM a 760 μM e a excreção urinária a partir de 864 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ a 7900 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$. A quantidade efetiva de sarcosina excretada em um período de 24 h parece estar relacionada com a idade, massa corporal e consumo alimentar de grupos metila.

Há dois relatos de caso que descrevem a concentração de sarcosina estar mais elevada em líquido de pacientes afetados. Em um deles, a concentração estava superior em 5mM dos níveis considerados normais, sendo que o paciente tinha 2 anos de idade. No outro, o nível foi superado em 17mM, sendo que o paciente tinha 5,8 anos (Scriver et al, 2001). A sarcosina em indivíduos do sexo masculino normalmente não é detectável no líquido (Levy, 1984). Relatórios

de hematológicas e bioquímicas ensaios em pacientes com sarcosinemia são escassos. É assumido que esses parâmetros foram medidos, mas não são anormais.

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 (Dzeja et al, 2003). A operação otimizada do sistema celular bioenergético exige que compostos ricos em energia, como ATP, sejam produzidos e entregues aos consumidores de ATP à taxa correspondente à velocidade de consumo (Dzeja et al, 2000).

Para estabelecer essa função de transferência de grupos fosforil, uma rede intracelular enzimática, catalisada principalmente pela creatina cinase (CK - E.C. 2.7.3.2), adenilato cinase (AK - E.C. 2.7.4.3) e enzimas glicolíticas (especialmente a piruvato cinase – PK – E.C. 2.7.1.40), atua em processos de produção e consumo de ATP (Figura 3) (Wallimann et al, 1994; Saks et al, 1996; Dzeja et al, 1998). A sinalização metabólica é dinâmica e através das enzimas da rede de transferência de grupos fosforil contribui para a eficiente comunicação energética intracelular na manutenção dos altos níveis de ATP celular (Dzeja et al, 2000; Neumann et al, 2003).

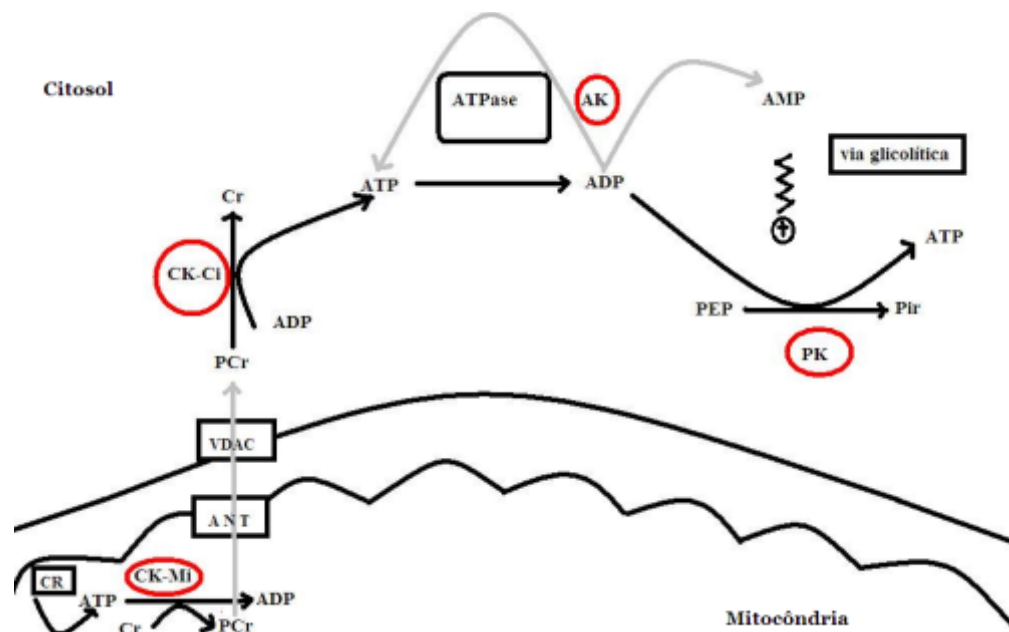


Figura 2 – Esquema das principais enzimas da rede de transferência de grupos fosforil em tecidos que consomem grande quantidade energética como, por exemplo, músculo esquelético, coração e cérebro. A entrega de fosfocreatina (PCr) é facilitada através de creatina cinase mitocondrial (CK-Mi) a partir do ATP gerado pela fosforilação oxidativa na cadeia respiratória. A PCr é exportada para o citosol e a creatina cinase citosólica (CK-Ci) é capaz de transferir o grupo fosfato da PCr para o ADP, formando ATP. A adenilato cinase (AK) é capaz de regenerar o ATP utilizando duas moléculas de ADP. Finalmente, a via glicolítica é estimulada por AMP proveniente da reação da AK e a piruvato cinase (PK) é capaz de sintetizar ATP a partir de fosfoenolpiruvato (PEP) e ADP. Como esses sistemas de transporte operam em conjunto, uma atividade diminuída de uma única enzima pode ser compensada. Entretanto, uma alteração da atividade de duas ou mais enzimas pode levar a um comprometimento cumulativo na comunicação entre sítios de geração e consumo de ATP. *Fonte: Elaborado pelo autor.*

A AK produz 10% do total da renovação de ATP no tecido muscular cardíaco, enquanto no músculo esquelético em repouso gera cerca de 4%. Por outro lado, a CK produz a maior parte do ATP (Dzeja et al, 1999). Apesar da porcentagem diminuída em relação à CK, a AK pode transferir e utilizar duas moléculas de ADP, podendo assim, em momentos de excessiva necessidade 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 e sua distribuição espacial está sendo cada vez mais conhecida (Dzeja et al, 2003). Em média, as concentrações de ATP, ADP e AMP são, respectivamente, 5, 1 e 0,1 mM (Noma, 2005). Modificações nas concentrações desses compostos podem alterar enzimas importantes e regulatórias em diversas rotas biossintéticas e oxidativas, que percebem mudanças no estado metabólico e energético celular (Dzeja et al, 2000). A simples difusão do ATP não parece ser 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, 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 regenerando ATP e creatina (Cr) (Figura 4). A enzima é formada por 400 aminoácidos com massa molecular de 306 a 380 kDa, conforme a isoforma. A CK participa na homeostasia de células com necessidades energéticas variáveis e intermitentes como, por exemplo, músculo esquelético e cardíaco, tecidos neurais como cérebro e retina, fotorreceptores e 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.

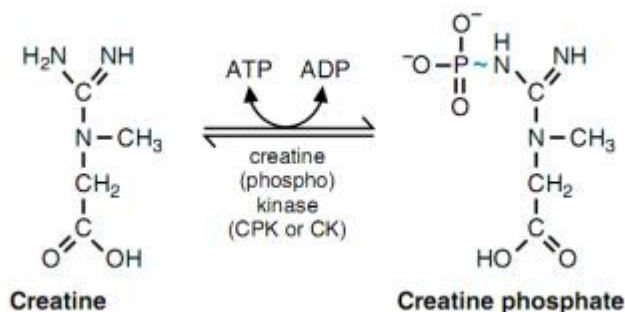


Figura 3 - Reação reversível catalisada pela CK. *Fonte: MARKS et al, 2007.*

As células contêm várias isoformas da CK que são identificadas por mobilidade eletroforética, distribuição tecidual e subcelular e sua sequência primária (Villarreal-Levy et al, 1987; Perryman et al, 1986). Há quatro principais isoenzimas da CK e os nomes são dados em função dos tecidos em que foram historicamente isoladas. Há 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 isoenzimas da CK citosólica são sempre co-expressadas em tecido específico junto com a isoforma mitocondrial. A interação entre as isoformas citosólica e mitocondrial é de fundamental importância na homeostasia energética celular (Silva et al, 2003).

As isoenzimas da CK são conhecidas por conterem o grupamento sulfidrílico no sítio ativo: cisteína 278 na CK mitocondrial e cisteína 283 na CK citosólica (Furter, 1993). Modificações ocorridas nos resíduos sulfidrílicos por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) diminuem a atividade da enzima, mostrando que esse grupamento também 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). Foi verificado que o peroxinitrito afeta a forma octamérica da CK-Mi e evita a re-octamerização da forma dimérica (Gross et al, 1996). As ERON elevam os níveis de cálcio intracelular (Ca^{2+}) e induzem apoptose (Mattson, 1992).

Usando fracionamento bioquímico e localização *in situ*, foi demonstrado que as isoenzimas da CK são extremamente solúveis. De fato, são compartimentadas subcelularmente e unidas funcional e/ou estruturalmente com sítios de produção de energia (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) (Figura 5) - (Wallimann et al, 1992). Dependendo das necessidades metabólicas da célula ou tecido, uma dessas diferentes funções do circuito CK/PCr pode estar dominante.

As isoenzimas CK-Mi estão localizadas na parte externa da membrana mitocondrial interna, assim como em sítios de contato com a membrana externa e interna, no espaço intermembranas, por união funcional com o carreador ATP/ADP (translocador adenina nucleotídeo - ANT) (Wallimann et al, 1992). Essa ligação funcional ocorre por meio da exportação eletrogênica da matriz mitocondrial geradora de ATP em troca de ADP através da membrana mitocondrial interna e a transfosforilação do ATP a PCr, conservando a energia livre

da hidrólise do ATP exportado pelo ANT (Wyss et al., 1992). A CK-Mi, por ser funcionalmente unida ao poro da membrana mitocondrial externa, provavelmente esteja envolvida na regulação da importação da creatina pela mitocôndria e exportação da PCr para o citosol (Wallimann et al, 1992; Wyss et al, 1992). Portanto, através da união cinética das três proteínas ANT, CK-Mi e o canal aniônico dependente de voltagem (VDAC), também conhecido como porina, forma-se um importante microcompartimento para o transporte de energia mitocondrial e metabolismo energético celular (Wallimann et al, 1992).

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.

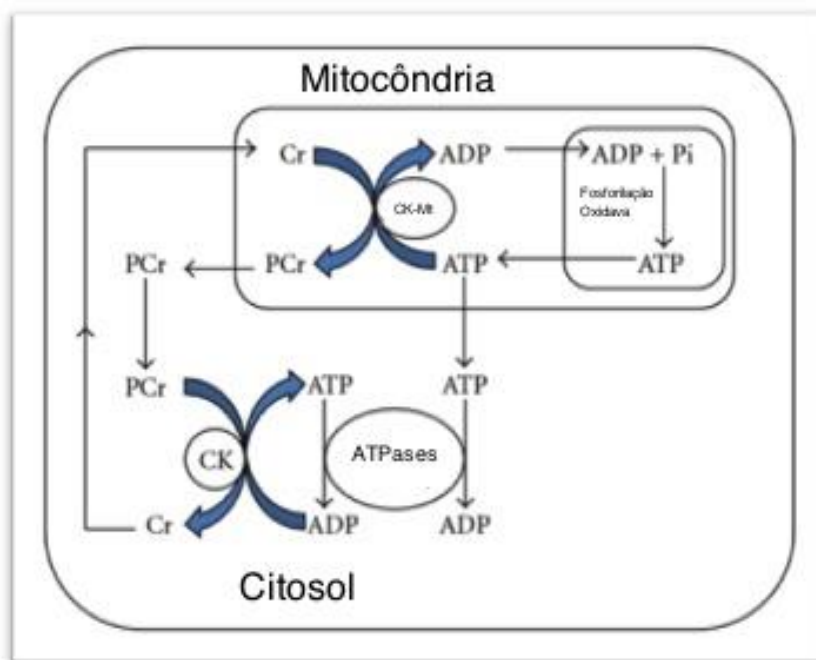


Figura 4 – Modelo do circuito creatina / fosfocreatina na homeostase energética intracelular. São mostradas duas isoformas da creatina cinase, uma CK-Mi e outra CK-MB. A CK-Mi está ligada funcionalmente à fosforilação oxidativa, enquanto a CK-MB pode estar associada à glicólise, ao armazenamento de energia mantendo o equilíbrio entre as relações PCr/Cr e ATP (trifosfato de adenosina) / ADP ou então sítios subcelulares de consumos altos e flutuantes de ATP. *Adaptado de Baird et al, 2012.*

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 funcionalmente associada aos processos que requeiram ATP, como por exemplo, bombas de íons (Wallimann et al, 1994). Esse circuito serve também como tampão de energia transportada entre compartimentos. Nesse papel, a PCr tem a função de transportadora de energia, conectando sítios de produção de energia, como fosforilação oxidativa mitocondrial, com sítios de utilização de energia, onde a CK-Mi tem um papel eminente. Essa função da CK é específica de diversas isoenzimas da CK em uma variedade de

tecidos, como músculos, eritrócitos, células fotorreceptoras e espermatozóides, por compartimentalização subcelular da PCr/Cr, ATP/ADP/Pi e pela localização, estrutura e propriedades funcionais da CK-Mi octamérica (Wallimann et al, 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 Na^+ , K^+ -ATPase (Whittingham, 1981); a adição de creatina aumenta os níveis de PCr, reduzindo a queda de ATP, a liberação de Ca^{2+} e a morte celular no SNC (Carter et al, 1995). Quantidades significativas da atividade da CK-Mi e de seu RNA mensageiro (RNAm) também foram observadas nos rins, onde a CK-Mi junto com a CK-BB, foi encontrada no córtex e na medula renal, provavelmente participando do transporte de sódio. O RNAm para a CK-Mi ubíqua foi a principal forma encontrada nos rins, placenta, intestino e cérebro (Wallimann et al, 1992).

Por fim, foi observado que, em ratos, o processo de mielinização, bem como as demais atividades do sistema nervoso, depende 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 – Adenilato cinase

A enzima AK, também conhecida como miocinase, é uma fosfotransferase com uma única cadeia polipeptídica de aproximadamente 200 aminoácidos que catalisa a interconversão de nucleotídeos adenina e desempenha um papel importante na homeostase da energia celular (Dzeja et al, 1999). A reação reversível catalisada pela AK:



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. 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 seis isoenzimas da AK (AK1 a AK6) (Noma et al, 2005). 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 a única a ser encontrada no núcleo celular (Noma et al, 2005).

I.1.3.1.3 – Piruvato cinase

A última etapa da via glicolítica é a transferência do grupo fosforil do fosfoenolpiruvato (PEP) ao ADP, catalisada pela PK, que requer K^+ e Mg^{2+} ou Mn^{2+} (Oberfelder et al, 1984). Considerando que a via glicolítica é um sistema fundamental para o metabolismo energético nos organismos, as enzimas glicolíticas estão presentes em todas as células ou tecidos dos mamíferos (Heyduk et al, 1992). Entretanto, cada tipo de tecido utiliza essas enzimas de uma maneira específica para seu metabolismo (Friesen et al, 1998). A manutenção do fluxo de energia e de nutrientes para dentro da célula é essencial para a homeostasia e o funcionamento celular. Nesse contexto, a PK de mamíferos desempenha um papel fundamental nas células eucarióticas. A PK é uma enzima homo-tetrâmera e cada subunidade (monômero) consiste em 4 domínios (A, B, C e N), que possuem um sítio ativo (Figura 6) (Consler et al, 1992). Nos mamíferos há 4 isoenzimas da PK que são referidas como tipo M1, L, R e M2 (Consler et al, 1989). Essas formas de isoenzimas diferem em suas propriedades químicas, físicas, cinéticas, eletroforéticas e imunológicas, bem como na distribuição nos tecidos. A isoenzima tipo M1 é o principal tipo nos tecidos especialmente diferenciados, tais como músculo esquelético, coração e cérebro adulto (Consler et al, 1988). O tipo L é predominante em tecidos gliconeogênicos, especialmente no fígado - onde se constitui no maior componente- e no rim, onde é o menor componente (Staal et al, 1985). O tipo R está presente nos eritrócitos e tecidos hematopoiéticos. A M2-PK é predominante no feto, em neoplasias e nos tecidos indiferenciados em proliferação, embora seja encontrada também em alguns tecidos adultos, em menor quantidade no fígado e em maior quantidade no rim (Friesen et al, 1998). As expressões dessas isoenzimas são reguladas durante o desenvolvimento. A M2-PK é a única detectável precocemente em tecido

fetal, sendo gradualmente substituída pelos tipos L-, R-, M1-, 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 M2-PK (Heyduk et al, 1992; Consler et al, 1992).

A reação catalisada pela PK requer, para sua atividade, cátions monovalentes e divalentes (Friesen et al, 1998). 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).

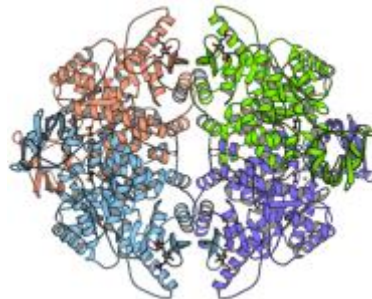


Figura 5 - PK de mamíferos é homo-tetrâmera, e cada subunidade (monômero) consiste de 4 domínios (A, B, C e N), cada um possuindo um sítio ativo.

I.1.3.1.4 – Hexocinase

A hexocinase (EC 2.7.1.1) é uma enzima irreversível, localizada no citosol, que 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 (Nelson e Cox, 2008). Essas isoenzimas são codificadas por genes diferentes, tendo propriedades cinéticas e regulatórias variadas (Nelson e Cox, 2008). Da Silva et al., 2004 demonstrou que a hexocinase cerebral está associada à membrana mitocondrial externa e que o ADP produzido pela enzima controla o potencial de membrana e a geração de espécies reativas. Além disso, os autores relataram que a atividade da hexocinase controla a síntese de ATP e a apoptose no cérebro.

I.1.3.1.5 – Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH - EC 1.2.1.12) 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 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).

I.1.3.2 – Complexos respiratórios e a fosforilação oxidativa

A fosforilação oxidativa é o processo principal da produção de ATP nas células que possuem mitocôndrias. Os passos oxidativos na degradação de carboidratos, lipídeos e aminoácidos convergem a esse estágio final da respiração celular, em que a energia da oxidação, provida pelo fluxo de elétrons através das enzimas da cadeia transportadora de elétrons, promove a síntese de ATP (Nelson e Cox, 2008). Quando não há hipóxia, a fosforilação oxidativa é dependente da concentração de ATP, ADP e fosfato inorgânico (Pi) e da razão mitocondrial de NADH/NAD⁺, que é determinada pela atividade da Cadeia Transportadora de Elétrons e pela transferência de elétrons provenientes de reações catalisadas por enzimas mitocondriais (Erecinska e Silver, 1994).

A cadeia transportadora de elétrons, composta por quatro complexos enzimáticos (complexos I-IV) além da ATPase (complexo V), recebe elétrons das coenzimas NADH e FADH₂, transferindo-os através de uma série de reações de oxidação-redução até o oxigênio molecular e simultaneamente acopla essa reação exergônica à translocação de prótons através da membrana mitocondrial interna (Wallace, 1999). O fluxo de prótons (gradiente eletroquímico de prótons) gerado durante o transporte de elétrons na cadeia transportadora de elétrons leva à formação de ATP a partir de ADP e Pi pelo complexo V (ATP sintase) (Babcock e Wikstrom, 1992; Wallace, 1999).

Os complexos da cadeia transportadora de elétrons são formados por várias cadeias polipeptídicas (complexos respiratórios) associadas a grupos transportadores de elétrons: NADH desidrogenase (complexo I); succinato:ubiquinona oxirredutase (complexo II); complexo citocromo b-c1 (complexo III) e citocromo c oxidase (complexo IV). Os complexos

da cadeia transportadora de elétrons também são formados por elementos móveis, que se localizam entre os complexos: a coenzima Q - um componente não protéico lipossolúvel que carrega elétrons entre os complexos I e III - e o citocromo c, uma proteína localizada na face externa da membrana, que transfere os elétrons do complexo III para o complexo IV (Marks, 2007).

I.1.4 - Bomba Na⁺,K⁺,ATPase

A Na⁺, K⁺, ATPase, ou bomba de sódio (Na⁺), é uma proteína integral de membrana, presente em praticamente todas as células, incluindo o cérebro, músculos esquelético e cardíaco. Ela está inserida na bicamada lipídica e é responsável pela geração do potencial de membrana através da translocação de Na⁺ e potássio (K⁺) contra seus gradientes de concentração. A energia necessária para a troca iônica é derivada da hidrólise de uma molécula de ATP (Kaplan, 2002). Além disso, essa enzima regula o volume e pH intracelular, mantém o potencial de membrana em repouso e auxilia no transporte de moléculas ligadas ao co-transporte de Na⁺, como aminoácidos, neurotransmissores e glicose (Jorgensen et al, 2003; Blanco, 2005; Taguchi, 2006).

A Na⁺, K⁺-ATPase pode ser regulada por diversos fatores como disponibilidade de substrato, componentes da membrana celular, hormônios e fosforilação (Lopina, 2000; Fambrough et al, 1994). Além disso, essa enzima é sensível ao ataque de radicais livres (Wang et al, 2003), sendo inibida por metabólitos formados durante a lipoperoxidação e por alterações na membrana plasmática (Rauchová et al, 1999; Chakraborty et al, 2003; Wang et al, 2003; Dencher et al, 2007).

I.1.5 – Espécies reativas

Os termos espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERON) são frequentemente usados para designar qualquer átomo ou molécula com existência independente, contendo um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos. Isso determina uma atração para um campo magnético, o que pode torná-lo altamente reativo, capaz de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora de elétrons (Valko et al, 2007).

As ER são átomos ou moléculas produzidas continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo. 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 do metabolismo celular aeróbico, o oxigênio molecular (O_2), através do citocromo oxidase mitocondrial, sofre redução tetravalente com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (Bergendi et al, 1999). No entanto, aproximadamente 5% do O_2 utilizado na cadeia respiratória mitocondrial não são reduzidos à H_2O , podendo ser convertidos em reativos intermediários (Boveris, 1998) (Figura 7).

As ERON podem ser produzidas no citoplasma, nas mitocôndrias ou membranas celulares. O alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (Anderson, 1996; Yu e Anderson, 1997). Entre as principais formas de espécies reativas 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 apresentando uma baixa capacidade de oxidação quando comparado com outras espécies reativas (Valko et al, 2007); radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$), que possui uma baixa capacidade de difusão e é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares; peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é capaz de atravessar a membrana nuclear e reagir com outros radicais induzindo danos a moléculas por meio de reações enzimáticas. O H_2O_2 pode participar de duas reações: a primeira é a reação de Fenton, onde H_2O_2 reage com Fe^{2+} formando Fe^{3+} e $\text{OH}\cdot$ e a segunda é a reação de Haber-Weiss, em que o H_2O_2 mais o $\text{O}_2^{\cdot-}$ também produzem $\text{OH}\cdot$ (Anderson, 1996).

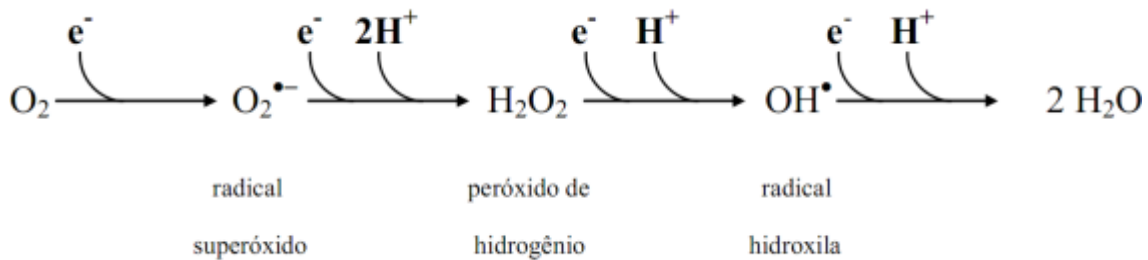


Figura 6: Redução tetravalente do oxigênio molecular na mitocôndria até a formação de água. *Adaptado de Boveris, 1998.*

Altas concentrações de ERON podem ser importantes mediadores de danos à estrutura celular, ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas. O $\text{OH}\cdot$ é a espécie mais reativa a todos os componentes do DNA, reagindo com bases púrica e pirimídicas. Outros constituintes celulares extremamente sensíveis a esse radical são os ácidos graxos poliinsaturados, onde o $\text{OH}\cdot$ ataca os resíduos de fosfolipídeos (Halliwell, 2000).

Os mecanismos pelos quais as espécies reativas oxidam proteínas está bem elucidado. A cadeia lateral dos aminoácidos de resíduos de proteínas são os alvos de oxidação, em particular 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 glutathiona reduzida (GSH). Podem, ainda, quebrar essas pontes de dissulfeto, inativando proteínas ativas (Valko et al, 2007). A concentração de grupos carbonil é gerada por diferentes mecanismos e são bons indicativos de presença de espécies reativas.

I.1.5.1 – Estresse oxidativo

O estresse oxidativo foi definido em 1991 como “um distúrbio do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante em favor do pró-oxidante, levando ao dano potencial”, como mostra a Figura 8 (Halliwell e Gutteridge, 1999).

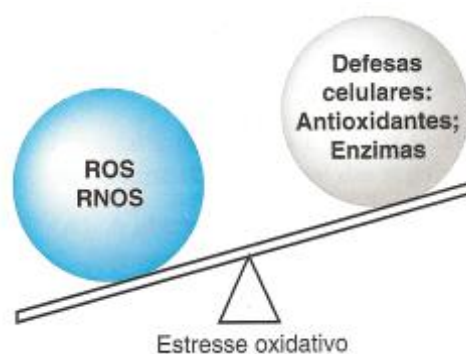


Figura 7: Estresse oxidativo x mecanismos de defesa. ROS: Espécies reativas de oxigênio, RNOS: Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. *Adaptado de: Marks et al, 2007.*

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, além de outros componentes celulares. 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 de defesa antioxidante [cobre-zinco superóxido dismutase (CuZnSOD), manganês superóxido dismutase (MnSOD), catalase (CAT) ou glutaciona 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 glutaciona, ou riboflavina, necessária para a produção de flavina adenina dinucleotídeo (FAD), um cofator da glutaciona redutase) (Halliwell e Gutteridge, 1999). De acordo com Halliwell (2000), "Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo".

I.1.6 – Sistemas 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).

O sistema de proteção que diminui a influência negativa de espécies reativas no organismo é constituído de defesas enzimáticas e não enzimáticas apresentadas no **Quadro 1**.

<i>SISTEMA DE PROTEÇÃO</i>	<i>EXEMPLOS</i>
Agentes que catalisam a remoção de radicais livres e outras “espécies reativas”	<ul style="list-style-type: none"> • Superóxido dismutase • Catalase • Glutathiona peroxidase • Antioxidantes-tióis-especificos
Proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidante como íon ferro, cobre e heme	<ul style="list-style-type: none"> • Transferrina • Haptoglobulinas • Hemopexina
Proteínas que protegem biomoléculas contra danos e agentes de baixo peso molecular que removam ERO/ERN	<ul style="list-style-type: none"> • Glutathiona • Ácido ascórbico • A-tocofenol • Provavelmente bilirrubina e ácido úrico

Quadro 1 - Defesas enzimáticas e não enzimáticas. *Adaptado de: Halliwell e Gutteridge, 1999; Bergendi et al, 1999.*

Do ponto de vista biológico, um antioxidante é um composto que, em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, reage com as espécies reativas e forma um substrato estável, impedindo a propagação da reação em cadeia (Bergendi et al, 1999).

As defesas celulares estão localizadas dentro das células, mais precisamente nos compartimentos hidrofílicos e hidrofóbicos. Já a maioria das enzimas citoprotetoras encontram-se solúveis dentro das células (Marshall e Bangert, 1995).

I.1.6.1 – Creatina

A creatina é um composto formado naturalmente no organismo humano, sendo encontrado primariamente no músculo esquelético e sintetizado endogenamente pelo fígado, rins e pâncreas a partir dos aminoácidos glicina e arginina (Wyss & Schulze, 2002). Nas células humanas, 60% a 70%, aproximadamente, correspondem à forma livre e 30% a 40%, à forma fosforilada (fosfocreatina) (Wallimann et al, 1998). 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, ressintetizando o ATP, principalmente no músculo esquelético, onde é degradado em condições de alta demanda energética dentro da célula (Wallimann et al, 1998). Além disso, essa amina é armazenada em outros tecidos, como coração, músculos lisos, testículos e cérebro (Wyss & Schulze, 2002). O transportador de creatina (SLC6A8) é expresso na barreira hematoencefálica e regula a concentração de creatina no cérebro, representando uma importante via para o fornecimento de creatina a partir da circulação sanguínea para o cérebro (Tarnopolsky, 2007).

Estudos recentes envolvendo a suplementação com creatina demonstram propriedades antioxidantes desse composto (Sestili et al, 2006; Hersch et al, 2006. Lawler e colaboradores (2002). Concluíram que a creatina 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 ($OONO^-$). Além disso, a creatina não mostrou uma significativa 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). Outros efeitos benéficos da creatina foram amplamente estudados em doenças neurodegenerativas, neuromusculares e neurometabólicas (Bender et al, 2006; Hersch et al, 2006; Tarnopolsky, 2007; Bolaños et al, 2009).

I.1.6.3 – Piruvato

O piruvato desempenha um papel chave no metabolismo intermediário como um produto da glicólise e para o complexo piruvato desidrogenase, conectando a via glicolítica com ciclo tricarboxílico (TCA) (Nelson e Cox, 2008).

Estudos demonstram que o piruvato pode ser neuroprotetor através do aumento do nível energético celular. O efeito antioxidante do piruvato α -cetoácidos já foi investigado tanto *in vitro* (Andrae, Singh e Ziegler-Skylakakis, 1985; O'Donnell-Tormey, 1987) quanto *in vivo* (Cavallinni, Valente e Rigobello, 1990; Salahudeen, Clark e Nath, 1991; Crestanello, Kamelgard e Whitman, 1995). *In vitro*, o piruvato aumenta a sobrevivência de neurônios no estriado diante da toxicidade mediada pelo peróxido de hidrogênio (Desagher, Glowinski e Premont, 1997) ou da toxicidade glutamatérgica (Maus, 1999) de neurônios no córtex cerebral (Sheline, Behrens e Choi, 2000). *In vivo*, o piruvato também apresenta proteção para os neurônios do hipocampo em um modelo de isquemia do prosencéfalo de rato (Lee, Kim e Koh, 2000).

Os antioxidantes têm sido extensamente investigados como agentes neuroprotetores para várias doenças neurodegenerativas. O piruvato, o metabólito final da glicólise, atua como um substrato energético celular chave, tendo funções antioxidantes (Tsacopoulos e Magistretti, 1996; Giandomenico, 1997).

2. OBJETIVOS

I.2.1. – Objetivos gerais

Considerando que pacientes com sarcosinemia manifestam sintomas neurológicos na infância, o objetivo geral do presente trabalho foi elaborar um modelo agudo de sarcosinemia e investigar o efeito *in vivo* de concentrações de sarcosina encontradas em pacientes com esse distúrbio sobre parâmetros bioquímicos do metabolismo energético e de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos Wistar. Além disso, investigamos o papel protetor da creatina e piruvato sobre possíveis alterações bioquímicas observadas no modelo.

I.2.2. – Objetivos específicos

1 - Elaborar um modelo agudo de sarcosinemia, através de parâmetros farmacocinéticos, injetando sarcosina três vezes ao dia no intervalo de três horas em ratos Wistar de 7, 14 e 21 dias de idade.

2 - Determinar o efeito da administração subcutânea de 0,5 $\mu\text{mol/g}$ de sarcosina sobre parâmetros do metabolismo energético e de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos Wistar de 21 dias de idade.

3 - 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 de ratos Wistar de 21 dias de idade.

PARTE II

ARTIGOS CIENTÍFICOS

II. CAPÍTULO I – Artigo 1

Chemically induced acute model of sarcosinemia in Wistar rats

Rodrigo Binkowski de Andrade, Tanise Gemelli, Denise Bertin Rojas, Carlos Severo Dutra-Filho, Clovis Milton Duval Wannmacher

Periódico: Metabolic Brain Disease

Status: Publicado

Qualis: B1

Chemically induced acute model of sarcosinemia in Wistar rats

Rodrigo Binkowski de Andrade¹, Tanise Gemelli¹, Denise Bertin Rojas¹, Carlos Severo Dutra-Filho¹, Clovis Milton Duval Wannmacher¹

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

Corresponding author: Clovis Milton Duval Wannmacher, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica. Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo - Porto Alegre – RS, Brasil, 90035-003.

Tel: 555133085575; E-mail: clovisdw@ufrgs.br

Keywords: Sarcosinemia; Metabolic disease; Animal model; Sarcosine

Abstract

In the present study, we developed an acute chemically induced model of sarcosinemia in Wistar rats. Wistar rats of 7, 14 and 21 postpartum days received sarcosine intraperitoneally in doses of 0.5 mmol/Kg of body weight three times a day at intervals of 3h. Control animals received saline solution (NaCl 0.85 g%) in the same volume (10 mL/Kg of body weight). The animals were killed after 30 min, 1, 2, 3 or 6 h after the last injection and the brain and the blood were collected for sarcosine measurement. The results showed that plasma and brain sarcosine concentrations achieved levels three to four times higher than the normal levels and decreased in a time-dependent way, achieving normal levels after 6 hours. Considering that experimental animal models are useful to investigate the pathophysiology of human diseases, our model of sarcosinemia may be useful for the research of the mechanisms of neurological dysfunction caused by high tissue sarcosine levels.

Introduction

Sarcosine is an N-methyl derivative of the amino acid glycine (Socala et al. 2010). This amino acid is a key intermediate in 1-carbon metabolism, and its elevation in blood and urine could reflect a deficient pool size of activated 1-carbon units (Deutsch et al. 2006; Zhang et al. 2009). In 2009, sarcosine was revealed to highly increase during prostate cancer progression to metastasis and can be detected noninvasively in urine (Jiang et al. 2010). Moreover, sarcosine or N-methylglycine is also an inhibitor of an important glycine transporter in brain and is under clinical investigation for conditions as N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor dysfunction, such as schizophrenia (Deutsch et al. 2006).

Sarcosinemia is a rare condition in which was originally described in 1966 in a child with mental retardation (Gerritsen and Waisman 1966). Sarcosinemia is a relatively rare autosomal recessive disorder that has a varied phenotypic presentation and is associated with neurodevelopmental and neurological abnormalities (Gerritsen and Waisman 1966). The incidence of this disease is < 1 in 350000 (New England) and <1 in 28000 (Quebec). The gene for human sarcosine dehydrogenase has been cloned and is located at chromosome 9q34. The enzymatic error of the most common phenotype of sarcosinemia affect the activity of sarcosine dehydrogenase (SARDH) (Bergeron et al. 1998; Scott 2001). In addition, convincing enzymatic data are lacking in these patients because of the rarity of the clinical condition and the ethical limitations imposed in obtaining liver or kidney tissue for biochemical evaluation (Scott 2001).

In patients with sarcosinemia ascertained because of neurologic symptoms, the concentration in blood is more than three times higher than the normal levels, ranging from 157 $\mu\text{mol/L}$ to 540 $\mu\text{mol/L}$ and urinary excretion from 864 $\mu\text{mol/24 h}$ to 7900 $\mu\text{mol/24 h}$. Scott (2001) demonstrated that the quantity of sarcosine excreted in a 24 h period appears is correlated to the person's age, body mass, and dietary intake of methyl groups. Moreover, the molecular basis of sarcosinemia, which previously was only speculated, was demonstrated with mutations in the SARDH gene in a six families from two different descents of French and Arab (Bar-joseph et al. 2012). In 2012, a study showed that four different mutations (P287L, V71F, R723X, R514X) were sequenced the gene encoding SARDH (Bar-joseph et al. 2012).

Animal experimental models can be used to better understand the pathophysiology of human diseases. In this context, our laboratory has developed animal models for some inherited metabolic disorders, such as phenylketonuria (Wyse et al. 1994, 1995), maple syrup urine

disease (Bridi et al. 2006), tyrosinemia type II (Sgaravatti et al. 2008), β -alaninemia (Gemelli et al. 2013), hyperprolinemia type II (Moreira et al. 1989), homocystinuria (Streck et al. 2002), methylmalonic and propionic acidemias (Dutra et al. 1991; Brusque et al. 1999), and hypermethioninemia (Stefanello et al. 2007). It has been recently reported that the 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (CCNU) can provoke oxidative stress in the liver of mice (Gadjeva, Tolekova and Vasileva, 2007). The possible effects this compound containing ethyl nitrosourea it is not useful as sarcosinemia model because we will evaluate oxidative stress parameters in the future.

In some of these models, we reproduced the peak levels achieved by the accumulating metabolites after overload during a critical period of brain development. In the present study we attempted to create a chemically induced experimental model of sarcosinemia by injecting sarcosine three times a day in Wistar rats of 7, 14, and 21 postnatal day.

Materials and methods

Animals and reagents

Wistar rats were obtained from the Central Animal House of the Department of Biochemistry, Institute of Basic Science of Health, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. The rats had free access to water and to a standard commercial chow (Supra, Porto Alegre, RS, Brazil) containing 20.5% protein (predominantly soybean supplemented with methionine), 54% carbohydrate, 4.5% fiber, 4% lipids, 7% ash and 10% moisture. Temperature was maintained at 24 ± 1 °C, with a 12–12 h light–dark cycle. The Principles of Laboratory Animal Care (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH publication no. 80-23, revised 1996; <http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/>) were followed in all the experiments, and the experimental protocol was approved by the Ethics Committee For Animal Research of the Federal University of Rio Grande do Sul. Sarcosine were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and were dissolved in saline. Sarcosine Colorimetric/Fluorometric Assay Kit was purchased from Biovision (San Francisco, CA, USA).

Tissue preparation

Wistar rats of 7, 14 and 21 days of life received an intraperitoneal injection of sarcosine (Sar). Blood was collected by decapitation at 30 min, 1, 2, 3 or 6 h after the last Sar injection, and the plasma was separated and centrifuged at 800 x g for 10 min at 4°. The olfactory bulbs, pons, medulla and the cerebellum were discarded and the cerebrum was homogenized in ten volumes of SET buffer (0.32 M sucrose, 1 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4). Plasma and cerebrum homogenates were deproteinized with 5% TCA (trichloroacetic acid) and centrifuged at 800 x g for 10 min. The supernatants were removed for Sar determination.

Sarcosine quantification

The concentrations of Sar in plasma and cerebrum were determined by BioVision's Sarcosine Assay Kit. The analysis is a convenient measure of sarcosine in variety biological samples. In the assay, sarcosine is specifically oxidized to generate a product that converts a colorless probe to a product with intense red color ($\alpha_{\max}=570$ nm). Sarcosine is therefore easily detected by either colorimetric or fluorometric methods with detection range 1-1000 μ M. Each sample was incubated at 37° C for 1h. Sar concentration was identified by apply sarcosine readings to the standard curve.

Chemically induced sarcosinemia

Doses of Sar administration were chosen in order to induce high plasma Sar levels similar to those found in patients affected by some conditions with increased plasma levels of sarcosine. Sarcosine doses of 0.5 μ mol/g of body weight and volumes of 10 μ L per g of body weight were chosen from pilot studies. We then determined the following pharmacokinetic parameters, apparent volume of distribution (Vd), plasmatic half-time ($t_{1/2}$) and plasmatic clearance (Clp) after Sar injection. Sarcosine was administered intraperitoneally three times a day with an interval of 3 h between injections to rats from the 7, 14 and 21 days of life. Control rats received saline solution at the same volumes.

Statistical analysis

Data from all the experiments were analyzed by the independent Student t test or by one-way ANOVA followed by Tukey test when F value was significant. Time-dependence was analyzed

by linear regression. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software. A value of $p < 0.05$ was considered to be significant.

Results

Linear regression showed that sarcosine plasma levels significantly decreased in a time-dependent way: [7 days of age: ($F(1,24) = 339.20$; $b = -0.96$; $p < 0.001$) (Fig. 1a); 14 days of age: ($F(1,24) = 169.79$; $b = -0.93$; $p < 0.001$) (Fig. 2a); 21 days of age: ($F(1,24) = 209.63$; $b = -0.94$; $p < 0.001$) (Fig. 3a).

Brain sarcosine concentrations were decreased in a time-dependent way as shown by linear regression [7 days: ($F(1,24) = 47.57$; $b = -0.82$; $p < 0.001$) (Fig. 1b); that chronic 14 days: ($F(1,24) = 158.32$; $b = -0.93$; $p < 0.001$) (Fig. 2b); 21 days: ($F(1,24) = 66.88$; $b = -0.86$; $p < 0.001$) (Fig. 3b).

The pharmacokinetic parameters apparent volume of distribution (V_d), plasmatic half-time ($t_{1/2}$) and plasmatic clearance (Cl_p) were determined after the last Sar injection (Table 1). It can be observed in the table that the $t_{1/2}$ decreased, while V_d and Cl_p increased with the advance of the animal age. These data suggest that the progressive maturation of the systems of transport and metabolism increases tissue uptake and metabolization of sarcosine as well renal excretion, decreasing the plasmatic clearance. Therefore, for chronic sarcosine administration doses must be increased or the time elapsed between the administrations must be reduced according to the age. This can be seen in the table 1.

Taking these data into consideration, we consider that the acute chemical model of sarcosinemia by injecting a buffered Sar solution three times a day with an interval of 3 h between injections at 7, 14 and 21 days of life, corresponding to the most vulnerable period of brain development in the rat is suitable for metabolic studies.

Discussion

In general, the different developmental periods in humans and rats follow the same schedule. The concordance between the behavioral and structural changes in humans and rats exposed to the same developmental neurotoxicants is, in many cases, impressively high (Schardein 1998). This important event in brain development is differently positioned in

relation to the time of birth. In humans the 'brain growth spurt' is almost completed before birth, while in rats it begins after birth and lasts up to the 21 postpartum day. These differences have important implications for extrapolation results obtained in studies with rats to risk assessment for human infants (Himwich 1973). Despite the difference in sensitivity and interindividual variability, animal data from experimental developmental neurotoxicity studies make good predictors for the risk of developmental neurotoxicity in humans, when developmental neurobehavioural and neuropathology endpoints are considered carefully (Kimmel 1998; Schardein 1998).

Timing of exposure is critical for the nature and extent of neurotoxic effects in the developing nervous system. The most critical periods are the periods of neurogenesis, neuronal migration and settling, and neuronal differentiation. Postnatal stage (preweaning period) goes from postnatal day (PD) 0 to PD 21. Several maturation processes occur along these 21 days: brain growth spurt; myelination gliosis (oligodendroglia cell proliferation); controlled neuro- and gliogenesis from both primary and secondary germinal matrix; controlled migration and settling; high rate of vascularization and blood brain barrier (BBB) development BBB maturation begins gestational day (GD) 15 and continues until postnatal day (PD) 24 (Schulze and Firth 1992); high rate of differentiation processes; steady increase of neurotransmitter system differentiation processes. Moreover, rapid rate of myelination occur from PD 16 to PD 30 in rats; sexual brain differentiation is completed at PD10 and maturation of noradrenergic neurotransmitter system is completed at PD14. Moreover, it has been reported that a period of exposure to opiates during adolescence can influence sexual maturation and selective gender specific effects on endocrine function in offspring (Cicero et al.,1990).

The postnatal stage is characterized by an extensive growth of the brain (brain growth spurt). In rats, neuronal cell populations are produced up to postnatal day 21 (at weaning); in the rat cerebrum, around half of all the cell population is produced in the postnatal period (Krinke and Eisenbrandt 1994). During the brain growth spurt, when oligodendroglial cell proliferation accelerates and differentiation processes such as dendritic development and arborization take place, a corresponding capillary sprouting is observed. It is thought that the amount of vascularization represents the metabolic needs in direct correlation with the rapidly growing brain regions (Jacobson 1978).

Postnatal processes that have to be considered when assessing potential developmental

neurotoxins are: axonogenesis, dendritic arborization, synaptogenesis, rapid development of all major neurotransmitter systems, developmental ('apoptotic') cell death, trimming (selective elimination of unimportant synapses, while preserving the most advantageous ones) and myelination (initiated by a marked proliferation of oligodendroglial cells (myelination gliosis) (Bayer et al. 1993; Bayer and Altman 1995).

Chemical animal models are not completely similar to human diseases in all its complexity. However, chemical animal models have been largely used because they have the advantage of study every substance known to accumulate in human disease against adequate control. Therefore, animal models are important in the investigation of pathophysiologic mechanisms of the diseases, especially in brain metabolism, helping to suggest preventive measures and new drugs for treatment (Skvorak 2009). Sarcosine load do not reproduces entirely sarcosinemia, because the enzyme sarcosine dehydrogenase is active in the rats, increasing the formation of the active 1-carbon fragment 5,10-methylenetetrahydrofolate, differently from the human disease. Therefore, the chemical model developed in the present work has some limitations. Several chemical models for rats were developed in our laboratories as stated before.

The main objective of this study was to induce high sustained levels of sarcosine in plasma and brain of rats similar to those found in sarcosinemia, a condition associated with elevated plasma levels and increased urinary excretion of sarcosine (N-methylglycine) (Gerritsen and Waisman 1966). The result showed that the maximal plasma sarcosine concentrations were reached 30 min after acute induced model of sarcosinemia in rats, gradually decreasing afterwards, but remained high for more than 3 h. Brain sarcosine concentration was maximal 60 min after injection, and corresponded to approximately 4- fold the normal values. Brain Sar concentrations also decreased along time, but remained relatively high for more than 3 h after the last injection. These data are in agreement with previous reports demonstrating that sarcosine crosses the blood-brain barrier by glycine transporter system (GlyT-1), which is a Na^+/Cl^- dependent transporter (Kracht et al., 2003; O'Kane and Hawkins, 2003; Scott 2001).

Sarcosine or N-methylglycine is an important intermediate in one-carbon metabolism (Ueland et al. 2007), a competitive inhibitor of the type I glycine transporter (GlyT1) (Smith et al. 1992; Lopez-Corcuera et al. 1998; Herdon et al. 2001; Mallorga et al. 2003), and an N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) co-agonist (Zhang et al. 2009).

Pharmacokinetics is the study of the absorption, distribution, biotransformation, and excretion of compounds. Pharmacokinetic parameters such as peak plasma concentrations (C_{max}), the time of peak absorption (T_{max}), the rate of clearance (CL), biological half-life ($T_{1/2}$), and the extent of distribution in the body, or apparent volume of distribution (V_d) are determined from these studies (Ross and Gillman 1990). Rats are used as the species of choice for this work primarily because of their size and the ease of obtaining samples (Marzo 1997).

The pharmacokinetic parameters measured after sarcosine administration showed that plasmatic clearance and apparent volume of distribution increased, decreasing plasmatic half-time as animal age increase. Although a causal link with sarcosinemia is not formally established, these data suggest that renal excretion and hepatic metabolism of sarcosine are not fully developed in very young rats. Additionally, we observed that the concentrations of sarcosine in the brain decreased more slowly than those in the plasma, remaining relatively high for more than 3 h after sarcosine last injection.

In the present study, sarcosine was administered during a period of rapid brain development (7, 14 and 21 days of life) in which crucial events occur, such as synaptogenesis (Clark et al. 1993), myelogenesis and intense neural proliferation (Enesco and Leblond 1962; Winick and Noble 1965). This chemical model could be suitable for more studies with the objective to demonstrate the effect of high brain sarcosine concentrations on neurochemical parameters in order to understand the neurological findings that have been reported in patients affected by sarcosinemia. However, it should be taken into consideration that sarcosine metabolites can enhance following sarcosine administration so the results obtained from this model should be interpreted with caution.

Acknowledgements

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

References

1. Bar-joseph B, Pras E, Reznik-Wolf H, et al (2012) Mutations in the sarcosine dehydrogenase gene in patients with sarcosinemia. *Hum Genet* 131: 1805-1810
2. Bayer SA, Altman J, Russo RJ, Zhang X (1993) Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology* 14:83-144
3. Bayer SA, Altman J (1995) Principles of neurogenesis, neuronal migration, and neural circuit formation. In: Paxinos G (ed) *The Rat Nervous System*, 3rd edn. Academic Press, San Diego, pp 1079–1098
4. Bergeron F, Otto A, Blache P, Day R, Denoroy L, Brandsch R, Bataille D (1998) Molecular cloning and tissue distribution of rat sarcosine dehydrogenase. *Eur J Biochem* 257:556-561
5. Brusque AM, Mello CF, Buchanan DN, Terraciano ST, Rocha MP, Vargas CR (1999) Effect of chemically induced propionic acidemia on neurobehavioural development of rats. *Pharmacol Biochem Behav* 64:529–34
6. Bridi R, Fontella FU, Pulrolnik V, Braun CA, Zorzi GK, Coelho D, Wajner M, Vargas CR, Dutra-Filho CS (2006) A chemically-induced acute model of maple syrup urine disease in rats for neurochemical studies. *J Neurosci Meth* 155:224-30
7. Cicero TJ, Adams ML, Giordano A, Miller BT, O'Connor L, Nock B (1990) Influence of morphine exposure during adolescence on the sexual maturation of male rats and the development of their offspring. *J Pharmacol Exp Ther* 256:1086-1093
8. Clark JB, Bates TE, Cullingford T, Land JM (1993) Development of enzymes of energy metabolism in the neonatal mammalian brain. *Dev Neurosci* 15:174–80
9. Deutsch SI, Rosse RB, Long KD, Gaskins B, Mastropaolo J (2006) Rare neurodevelopmental abnormalities of sarcosinemia may involve glycinergic stimulation of a primed N-methyl-d-aspartate receptor. *Clin Neuropharmacol* 29:361-3
10. Dutra JC, Wajner M, Wannmacher CMD, Wannmacher LE, Pires RF, Rosa-Junior A (1991) Effect of postnatal methylmalonate administration on adult rat behavior. *Braz J Med Biol Res* 24:595–605
11. Enesco M, Leblond CP (1962) Increase in cell number as a factor in the growth of the

- organs and tissues of the young male rat. *J Embryol Exp Morphol* 10:530–62
12. Gadieva V, Tolekova A and Vasileva M (2007) Effect of the spin-labelled 1-ethyl-1-nitrosourea on CCNU-induced oxidative liver injury. *Pharmazie* 62:608-13
 13. Gemelli T, de Andrade RB, Rojas DB, Bonorino NF, Mazzola PN, Tortorelli LS, Funchal C, Dutra-Filho CS, Wannmacher CMD (2013) Effects of b-alanine administration on selected parameters of oxidative stress and phosphoryltransfer network in cerebral cortex and cerebellum of rats. *Mol Cell Biochem.* 80:161-70. doi:10.1007/s11010-013-1669-8
 14. Gerritsen T, Waisman HA (1966) Hypersarcosinemia: an inborn error of metabolism. *N Engl J Med* 275:66-9
 15. Herdon HJ, Godfrey FM, Brown AM, Coulton S, Evans JR, Cairns WJ (2001) Pharmacological assessment of the role of the glycine transporter GlyT-1 in mediating high-affinity glycine uptake by rat cerebral cortex and cerebellum synaptosomes. *Neuropharmacology* 41:88–96
 16. Himwich WA (1973) Problems in Interpreting Neurochemical Changes Occurring in Developing and Aging Animals. In: Ford DH (ed) *Neurobiological Effects of Maturation and Aging*. Progress in Brain Research, Elsevier Scientific, Amsterdam, pp 13-23
 17. Jacobson M (1978) Histogenesis and morphogenesis of the central nervous system. In: Jacobson M (ed) *Developmental Neurobiology*, Plenum Press, New York, pp 57-114
 18. Jiang Y, Cheng X, Wang C, Ma Y (2010) Quantitative determination of sarcosine and related compounds in urinary samples by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 82:9022-7. doi:10.1021/ac1019914
 19. Kimmel CA (1998) Current approaches. In: Slikker WJr, Chang LW (ed) *Developmental Neurotoxicology*, Academic Press, San Diego, pp 675-685
 20. Kracht LW, Friese M, Herholz K, Schroeder R, Bauer B, Jacobs A, Heiss WD (2003) Methyl-[11C]- l-methionine uptake as measured by positron emission tomography correlates to microvessel density in patients with glioma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30:868-73

21. Krinke G, Eisenbrandt DL (1994) In: Mohr U, Dungworth DL, Capen CC (ed) Pathobiology of the Aging Rat, ILSI Press, Washington DC, pp 3-9
22. Lopez-Corcuera B, Martinez-Maza R, Nunez E, Roux M, Supplisson S, Aragon C (1998) Differential properties of two stably expressed brain-specific glycine transporters. *J Neurochem* 71:2211–2219
23. Marzo A (1997) Clinical pharmacokinetic registration file for NDA and ANDA procedures. *Pharmacol Res* 36:425-50
24. Moreira JC, Wannmacher CMD, Costa SM, Wajner M (1989) Effect of proline administration on rat behavior in aversive and nonaversive tasks. *Pharmacol Biochem Behav* 32:885–90
25. Mallorga PJ, Williams JB, Jacobson M, Marques R, Chaudhary A, Conn PJ, Pettibone DJ, Sur C (2003) Pharmacology and expression analysis of glycine transporter GlyT1 with [3H]-(N-[3-(4'-fluorophenyl)-3-(4'phenylphenoxy)propyl])sarcosine. *Neuropharmacology* 45:585–593
26. O'Kane RL, Hawkins RA (2003) Na⁺-dependent transport of large neutral amino acids occurs at the abluminal membrane of the blood-brain barrier. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:1167-73
27. Ross EM, Gilman AG (1990) Pharmacodynamics: Mechanism of drug action and the relationship between drug concentration and effect. In: Gilman AG, Goodman LS, Rall TW, Murad F (ed) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8rd edn. Macmillan Publishing Company, New York, chapter 2
28. Schardein JL (1998) Animal/Human Concordance In: Slikker WJr, Chang LW (ed) *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Academic Press, San Diego, pp 687-708
29. Schulze C, Firth JA (1992) Interendothelial junctions during blood-brain barrier development in the rat: morphological changes at the level of individual tight junctional contacts. *Dev Brain Res* 69:85-95
30. Scott CR (2001) Sarcosinemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (ed) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. The McGraw-Hill Companies, New York, pp 2057-2063
31. Sgaravatti AM, Vargas BA, Zandoná BR, Deckmann KB, Rockenbach FJ, Moraes TB, Monserrat JM, Sgarbi MB, Pederzoli CD, Wyse AT, Wannmacher CM, Wajner M,

- Dutra-Filho CS (2008) Tyrosine promotes oxidative stress in cerebral cortex of Young rats. *Int J Dev Neurosci* 26:551–559
32. Skvorak KJ (2009) Animal models of maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis* 32:229-246
 33. Smith KE, Borden LA, Hartig PR, Branchek T, Weinshank RL (1992) Cloning and expression of a glycine transporter reveal colocalization with NMDA receptors. *Neuron* 8:927–935
 34. Socala K, Nieoczym D, Rundfeldt C, Wlaz (2010) Effects of sarcosine, a glycine transporter type 1 inhibitor, in two mouse seizure models. *PHARMACOL REP* 62: 392-397
 35. Stefanello FM, Matté C, Scherer EB, Wannmacher CMD, Wajner M, Wyse ATS (2007) Chemically induced model of hypermethioninemia in rats. *J Neurosci Methods* 160:1-4
 36. Streck EL, Matté C, Vieira PS, Rombaldi F, Wannmacher CMD, Wajner M (2002) Reduction of Na⁺,K⁺-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to chemically induced hyperhomocysteinemia. *Neurochem Res* 27:1593–8
 37. Ueland PM, Midttun O, Windelberg A, Svardal A, Skalevik R, Hustad S (2007) Quantitative profiling of folate and one-carbon metabolism in large-scale epidemiological studies by mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 45:1737–1745
 38. Winick M, Noble A (1965) Quantitative changes in DNA, RNA and protein during prenatal and postnatal growth in rat. *Dev Biol* 12:451–66
 39. Wyse ATS, Sarkis JF, Cunha-Filho JS, Teixeira MV, Schetinger MR, Wajner M, et al (1994) Effect of phenylalanine and its metabolites on ATP diphosphohydrolase activity in synaptosomes from rat cerebral cortex. *Neurochem Res* 19:1175–80
 40. Wyse ATS, Sarkis JF, Cunha-Filho JS, Teixeira MV, Schetinger MR, Wajner M (1995) ATP diphosphohydrolase activity in synaptosomes from cerebral cortex of rats subjected to chemically induced phenylketonuria. *Braz J Med Biol Res* 28:643–9
 41. Zhang HX, Hyrc K, Thio LL (2009) The glycine transport inhibitor sarcosine is an NMDA receptor co-agonist that differs from glycine. *J Physiol* 587:3207–3220

Legends to Figures

Fig. 1 Sarcosine plasma (A) and brain (B) levels following sarcosine administration of 0.5 μ mol/g intraperitoneally in 7-day-old Wistar rats. Blood and brain were collected 30 min, 1, 2, 3 or 6 h after the last injection. Results are expressed as μ mol/L of sarcosine. Data are expressed as mean \pm S.D. for five animals in each group

Fig. 2 Sarcosine plasma (A) and brain (B) levels following sarcosine administration of 0.5 μ mol/g intraperitoneally in 14-day-old Wistar rats. Blood and brain were collected 30 min, 1, 2, 3 or 6 h after the last injection. Results are expressed as μ mol/L of sarcosine. Data are expressed as mean \pm S.D. for five animals in each group

Fig. 3 Sarcosine plasma (A) and brain (B) levels following sarcosine administration of 0.5 μ mol/g intraperitoneally in 21-day-old Wistar rats. Blood and brain were collected 30 min, 1, 2, 3 or 6 h after the last injection. Results are expressed as μ mol/L of sarcosine. Data are expressed as mean \pm S.D. for five animals in each group

Figure 1

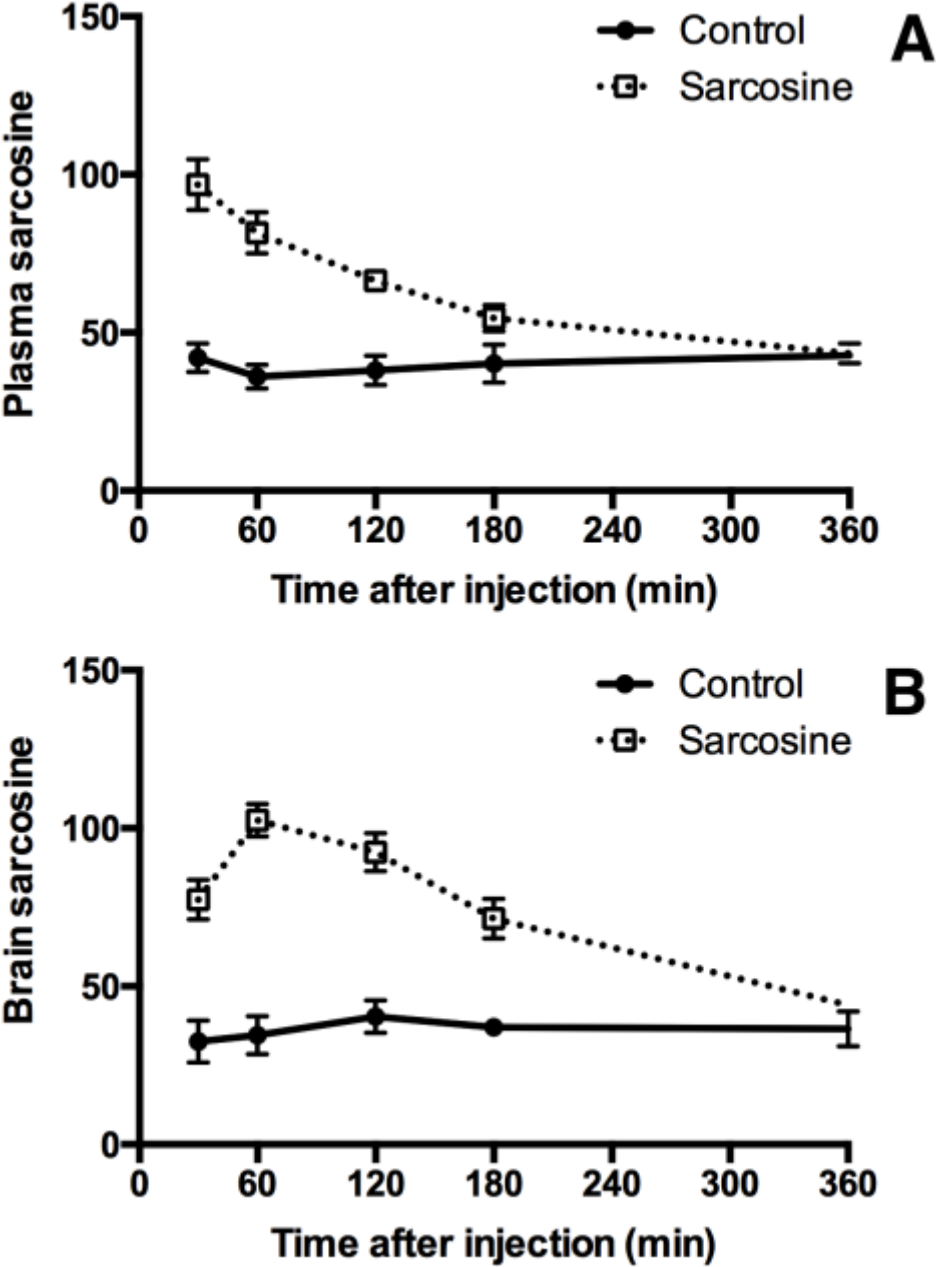


Figura 2

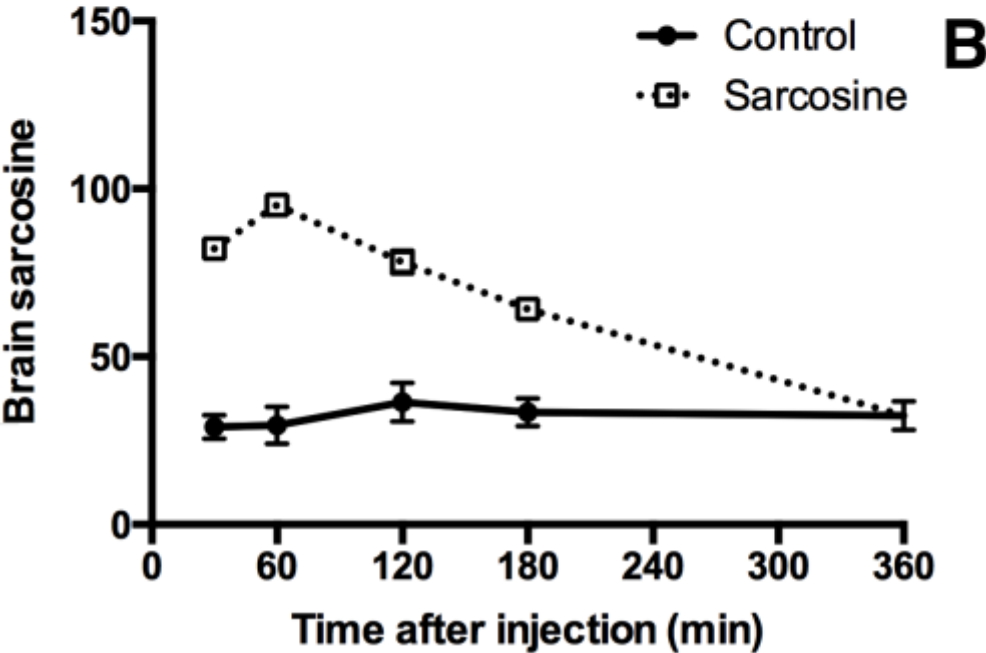
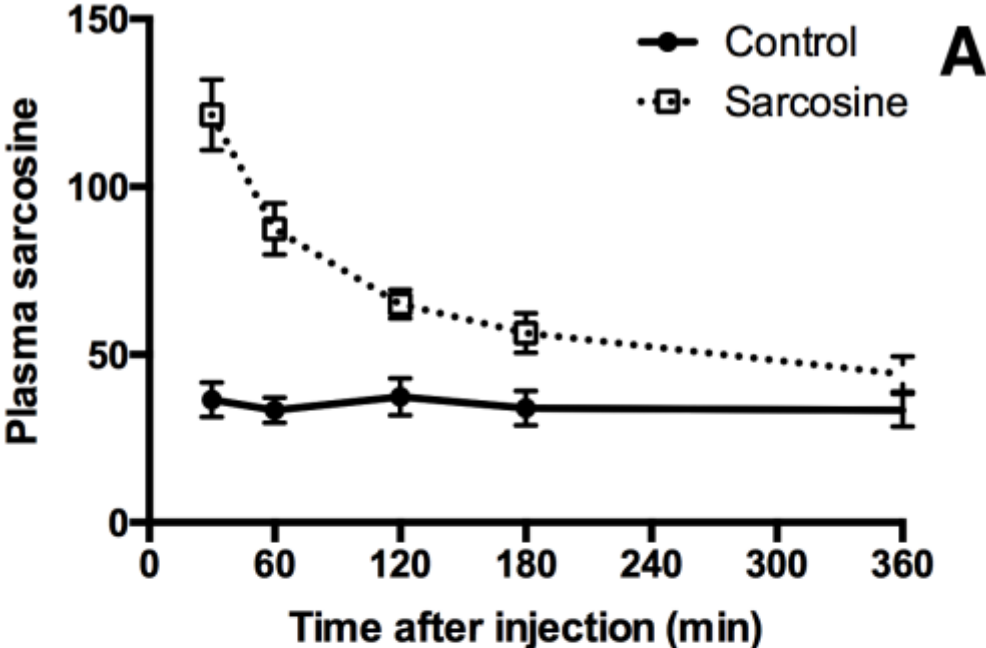
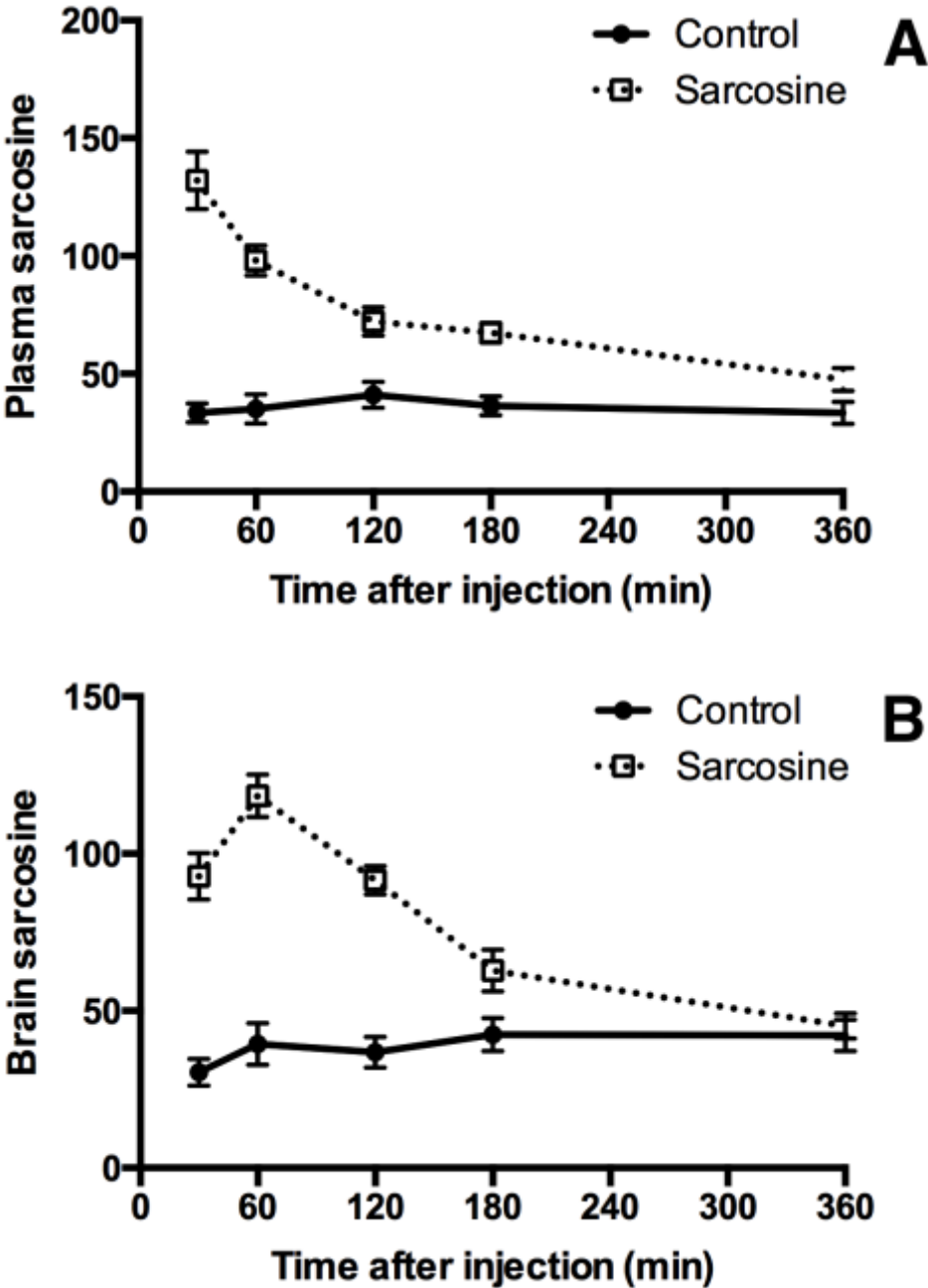


Figure 3



II. CAPÍTULO II – Artigo 2

Evaluation of oxidative stress parameters and energy metabolism in cerebral cortex of rats subjected to sarcosine administration

Rodrigo Binkowski de Andrade, Tanise Gemelli, Denise Bertin Rojas, Tomas Duk Hwa Kim, Ângela Zanatta, Felipe Schmitz, André Felipe Rodrigues, Angela TS Wyse, Moacir Wajner, Carlos Severo Dutra-Filho, Clovis Milton Duval Wannmacher

Periódico: Molecular Neurobiology

Status: Publicado

Qualis: A1

Evaluation of oxidative stress parameters and energy metabolism in cerebral cortex of rats subjected to sarcosine administration

Rodrigo Binkowski de Andrade^{1,2,3}, Tanise Gemelli¹, Denise Bertin Rojas¹, Tomas Duk Hwa Kim², Ângela Zanatta¹, Felipe Schmitz¹, André Felipe Rodrigues¹, Angela TS Wyse^{1,2}, Moacir Wajner^{1,2}, Carlos Severo Dutra-Filho^{1,2}, Clovis Milton Duval Wannmacher^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600, CEP 90.035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.

²Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600, CEP 90.035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

³Faculdade da Serra Gaúcha, FSG, Rua Os Dezoito do Forte, 2366, CEP 95.020-472 Caxias do Sul, RS, Brazil

CORRESPONDING AUTHOR: Rodrigo Binkowski de Andrade, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica. Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo - Porto Alegre – RS, Brasil, 90035-003. Tel: 5551 33085575

E-mail: andbink@gmail.com

ABSTRACT

Sarcosine is an N-methyl derivative of the amino acid glycine, and its elevation in tissues and physiological fluids of patients with sarcosinemia could reflect a deficient pool size of activated 1-carbon units. Sarcosinemia is a rare inherited metabolic condition associated with mental retardation. In the present study, we investigated the acute effect of sarcosine and/or creatine plus pyruvate on some parameters of oxidative stress and energy metabolism in cerebral cortex homogenates of 21-day-old Wistar rats. Acute administration of sarcosine induced oxidative stress and diminished the activities of adenylate kinase, GAPDH, complex IV and mitochondrial and cytosolic creatine kinase. On the other hand, succinate dehydrogenase activity was enhanced in cerebral cortex of rats. Moreover, total sulfhydryls content was significantly diminished, while DCFH oxidation, TBARS content, and activities of SOD and GPx were significantly enhanced by acute administration of sarcosine. Co-administration of creatine plus pyruvate was effective in the prevention of alterations provoked by sarcosine administration on the oxidative stress and the enzymes of phosphoryltransfer network. These results indicate that acute administration of sarcosine may stimulate oxidative stress and alter the energy metabolism in cerebral cortex of rats. In case these effects also occur in humans, they may contribute, along with other mechanisms, to the neurological dysfunction of sarcosinemia, and creatine and pyruvate supplementation could be beneficial to the patients.

Keywords: Sarcosine; Sarcosinemia; Energy metabolism; Cerebral cortex; Oxidative stress

Introduction

Sarcosinemia is a relatively rare autosomal recessive condition that has a varied phenotypic presentation and is associated with neurodevelopmental and neurological abnormalities [1]. In this disease the enzymatic error of the most common phenotype of sarcosinemia affect the activity of sarcosine dehydrogenase [2,3]. Besides, some studies have shown that sarcosinemia is characterized by mental retardation, hypertonia, and tremors, high excretion of sarcosine in the urine and elevated levels of sarcosine (15 to 31 mM) in plasma [1].

Sarcosine is an N-methyl derivative of glycine found mainly in muscles but also in other body tissues. This amino acid is involved in one-carbon cycle pathway along with glycine synthesis and degradation [4]. Sarcosine is an inhibitor of the glycine transporter-1 (GlyT1), which is in charge of synaptic glycine reuptake [5] and may influence glycine neurotransmission. In this regard, some clinical studies have demonstrated that sarcosine shows antipsychotic activity in patients with schizophrenia [6,7].

Oxidative stress is characterized by a significant increase in intracellular concentration of oxidizing species such as reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) and/or by the loss of antioxidant defenses [8]. Due to its high reactivity, pro-oxidants can cause damage to cellular constituents or important biomolecules such as DNA, proteins, lipids, and carbohydrates [9]. To prevent this undesirable damage, there are antioxidants compounds and enzymes such as vitamin E, vitamin C, creatine, pyruvate, reduced glutathione, uric acid, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and superoxide dismutase (SOD) [8,10].

Pyruvate kinase (PK) (EC 2.7.1.40), a thiol-containing enzyme, catalyses a crucial step in the glycolytic pathway of the brain and is present in all tissues. Adenylate kinase (AK) (EC 2.7.4.3) catalyzes the reversible phosphoryltransfer between ATP and AMP [11, 12]. This enzyme, along with creatine kinase (CK) (EC 2.7.3.2), hexokinase (HK) (EC 2.7.1.1) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12) are responsible for the enzymatic phosphoryl transfer network or, in other words, responsible for the transfer of the phosphoryl of ATP where it is produced (mainly in the mitochondrial) to the place where it is consumed (mainly in the cytosol) [12]. Moreover, the respiratory chain is an essential

component of oxidative phosphorylation and is coupled to the synthesis of ATP from ADP and Pi [13].

Considering that mitochondrial respiratory chain and enzymatic phosphoryl transfer network are crucial for brain energy metabolism and function, that oxidative stress has been consistently linked to neurodegenerative diseases and that the mechanisms underlying the neurological dysfunction in sarcosinemia patients are poorly known, in this work we investigated effect of acute administration of sarcosine and/or creatine plus pyruvate on oxidative phosphorylation (the activities of the respiratory chain complexes II–IV), enzymatic phosphoryl transfer network (PK, AK, HK, CK, and GAPDH activities) and neurotransmission (Na^+ , K^+ -ATPase activity) in cerebral cortex homogenates of young rats.

Materials and methods

Animals and reagents

Wistar rats (21 days old) were obtained from the Central Animal House of Biochemistry Department, Institute of

Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. They were maintained on a 12:12 h light/dark cycle (lights on 07:00–19:00 h) in an air-conditioned room with constant temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) colony, with free access to water and 20%(w/w) protein commercial chow. Animal care followed the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication 80-23, revised 1996; <http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/>) and was approved by the University Ethical Committee. All chemicals products were purchased from Sigma.

Drugs Administration

Twenty eight 21-day-old Wistar rats were randomly divided into four groups: Saline (n = 7),

Sar (n = 7), Cre + Pyr (n = 7), Sar + Cr + Pyr (n = 7). All the animals received the same volumes of saline (0.9% buffered to pH 7.4) and/or Cre (10 $\mu\text{L/g}$ of body weight) plus Pyr solution (10 $\mu\text{L/g}$ of body weight), and/or Sar solution (20 $\mu\text{L/g}$ of body weight). Initially, half of the rats received Cre (0.4 $\mu\text{g/g}$ of body weight) plus Pyr (0.4 $\mu\text{g/g}$ of body weight) solution and the other half received saline solution intraperitoneally with an interval of 3 h between injections beginning at 9:00 a.m of 21-day-old with free access to water and a commercial chow. Animals received subcutaneous injections of Sar solution (0.5 $\mu\text{mol/g}$ of body weight) or saline solution at 3 h of interval, according to its group [14]. Our previous findings of an acute chemically induced model of sarcosinemia in Wistar rats showed that plasma and brain sarcosine concentrations achieved levels of three to four times higher than the normal levels and decreased in a time-dependent way[14]. The rats were euthanized one hour after last injection and the cerebral cortex was collected and homogenized for evaluating of oxidative stress and energy metabolism parameters.

Tissue Preparation

Rats were sacrificed by decapitation without anesthesia and the brain was immediately removed and dissected on a glass dish over ice. The cerebellum, olfactory bulbs and pons/medulla were discarded. For the measurements of the oxidative stress parameters, the cerebral cortex was 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 determination of the parameters of oxidative stress and protein. For assays of the enzymes of phosphoryltransfer network, the cerebral cortex was 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 the same SET buffer with a Potter-Elvehjem glass homogenizer. The homogenate was centrifuged at 800 x g for 10 min at 4°C. Part of the supernatant was used for determination of AK, GAPDH, HK, and activities; the pellet was discarded and the rest of the supernatant was centrifuged at 10,000 x g for 15 min at 4°C. The supernatant of this second centrifugation, containing cytosol and others cellular components as endoplasmatic reticulum, was collected for determination of PK and cytosolic CK activity. The pellet, containing mitochondria, myelin, synaptosomes and

membrane fragments was washed twice with the same SET buffer, resuspended in 100 mM Trizma-15 mM MgSO₄ buffer, pH 7.5, for determination of mitochondrial CK activity.

Enzyme assays of phosphoryltransfer network

Determination of Hexokinase Activity

The activity of mitochondrial bound hexokinase was determined based on a previously described method with minor modifications [15]. Briefly, mitochondrial protein used in this assay varied from 0.03–0.08 mg/mL, and the activity of hexokinase was determined by NADH formation following the absorbance at 340 nm. The assay medium contained 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 mM Ap5A as an inhibitor of adenylate kinase, 5 mM D-glucose, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM NAD⁺, and 1 unit/ml Glc-6-P dehydrogenase (*Leuconostoc mesenteroides*) in a final volume of 1 mL. The reaction temperature was 37°C.

GAPDH activity assay

GAPDH activity was measured as described by Mazzola and Sirover with minor modifications [16]. Reaction mixtures contain 2.2 mM glyceraldehyde-3-phosphate, 0.25 mM NAD⁺ and buffer medium, pH 8.9, (100 mM glycine, 100 mM potassium phosphate monobasic and 5mM EDTA). The sample was mixed and preincubated for 15 min at room temperature before inclusion of glyceraldehyde-3-phosphate in the reaction mixture. The activity of GAPDH was determined by NADH formation following the absorbance at 340 nm. Assays were performed in triplicate.

Pyruvate kinase

PK activity was assayed essentially as described by Leong [17]. The incubation medium consisted of 0.1 M Tris/ HCl buffer, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 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 0–90 min of pre-incubation at 37°C, the reaction was started by the addition of 1.0 mM PEP. All assays were performed in duplicate at 25°C. Results were expressed as μmol of pyruvate per min per mg of protein.

Adenylate kinase

AK activity was measured with a coupled enzyme assay with HK and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), according to Dzeja [18]. The reaction mixture contained 100 mM KCl, 20 mM HEPES, 20 mM glucose, 4 mM MgCl_2 , 2 mM NADP^+ , 1 mM EDTA, 4.5 U/ml of HK, 2 U/mL of G6PD, and 1 μg of protein homogenate. After 0–90 min of pre-incubation at 37°C, the reaction was initiated by the addition of 2 mM ADP and the reduction of NADP^+ was followed at 340 nm for 3 min in a spectrophotometer (Spectronic Genesys 8, Spectronic Instruments, Rochester, New York, USA). ADP, NADP^+ , G6PD, and HK were dissolved in water. Reagents concentration and assay time (3 min) were chosen to assure the linearity of the reaction. Creatine plus pyruvate did not interfere with HK or G6PD activities or with spectrophotometric readings. The results were expressed in μmol of ATP formed per min per mg of protein.

Creatine kinase

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_4 , and 1 μg of protein in a final volume of 0.1 ml. After 5 min of pre-incubation at 37°C, the reaction was started by the addition of 0.3 μmol of ADP. The reaction was stopped after 10 min by the addition of 1 μmol of p-hydroxymercuribenzoic acid. The reagent concentrations and the incubation time were chosen to assure linearity of the enzymatic reaction. Appropriate controls were carried out to measure chemical hydrolysis of phosphocreatine. The creatine (Cr) formed was estimated according to the colorimetric method of Hughes [19]. The color was developed by the addition of 0.1 ml 2% α -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 μmol of Cr formed per min per mg of protein.

Determination of the respiratory chain complexes activities

The activities of the respiratory chain enzyme complexes succinate-2,6-dichlorophenolindophenol-oxireductase (complex II) and succinate:cytochrome c oxireductase (complex II + CoQ + complex III) were determined in brain cortex homogenates according to the method of Fischer [20]. The activity of cytochrome c oxidase (complex IV) (COX) was measured according to Rustin [21]. Succinate:phenazine methosulfate oxireductase (succinate dehydrogenase-SDH) activity was measured according to Sorensen and Mahler [22]. Briefly, the assays for measuring complex activities contained: complex I+III – 20 mM phosphate buffer, pH 8.0, 200 mM KCN, 1 mM NADH, 2 mM cytochrome c, 1 mM EDTA, 2 mM rotenone and 5 μL of the homogenate in a final volume of 980 μL ; complex II+III - 62.5 mM phosphate buffer, pH 7.4, 2 mM cytochrome c, 100 mM sodium azide, 2 mM rotenone, 250 mM sodium succinate, and 20 μL of the homogenate in a final volume of 602 μL ; complex II and SDH - 62.5 mM phosphate buffer, pH 7.4, 100 mM sodium azide, 2 mM rotenone, 250 mM sodium succinate, 0.5 mM DCIP, 24 mM phenazine methosulfate, and 20 μL of homogenate in a final volume of 577 μL for complex II and 602 μL for SDH assay; complex IV - 10 mM phosphate buffer, pH 7, 125 mM dodecyl maltoside, 2mM cytochrome c, and 1 μL of the homogenate in a final volume of 1021 μL . Assays were carried out at 25 C. Complex II and SDH activities were determined by measuring DCIP reduction at 600 nm in a double beam spectrophotometer. Complex II+III activities were determined by measuring cytochrome c reduction at 600 nm, and complex IV by measuring cytochrome c oxidation at 600 nm. Results of complex II are expressed as nmol of DCIP (Dichlorophenolindophenol) reduction per min per mg of protein, the results of complex II-III are expressed as nmol of cytochrome c reduction per min per mg of protein, the results of complex IV activity are expressed as nmol of cytochrome c oxidation per min per mg of protein and the results of SDH (succinate dehydrogenase) activity are expressed as nmol of DCIP reduction per min per mg of protein.

Parameters of oxidative stress measurements

Total sulfhydryl content

The sulfhydryl assay was performed according to a previously published method of Aksenov [23], where the reduction of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, generating a yellow derivative (TNB) whose absorption was measured spectrophotometrically at 412 nm. Briefly, 0.1 mM DTNB was added to 120 μ l of cerebral cortex supernatants. This was followed by 30-min incubation at room temperature in a dark room. Absorption was measured at 412 nm. The sulfhydryl content may be inversely correlated to oxidative damage to proteins, but may also reflect GSH and others thiols levels. Results were calculated as nmol of TNB per mg of protein.

2',7'-dihydrodichlorofluorescein oxidation assay

Oxygen and nitrogen reactive species production was assessed according to LeBel [24] by using reduced 2',7'-dihydrodichlorofluorescein diacetate (DCF-DA). Samples (30 μ L) were incubated for 30 min at 37 °C in the dark with 30 μ L of 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 with 140 mM KCl and 240 μ L of 100 μ M reduced 2',7'- dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) solution in a 96 wells plate. H₂DCF-DA is cleaved by cellular esterases and H₂DCF formed is oxidized by reactive oxygen species (ROS) or reactive nitrogen species (RNS) presenting in samples to DCF. The DCF fluorescence intensity parallels to the amount of reactive species formed. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 480 nm and 535 nm, respectively. Calibration curve was performed with standard DCF (0.25–10 μ M) and the levels of reactive species were expressed as nmol of DCF formed per mg of protein.

Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD catalyzes the transformation of superoxide free radicals in hydrogen peroxide, a less reactive substance. The assay of SOD activity was carried out as described by Marklund [25]. This method is based on capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on

superoxide radical. The inhibition of autoxidation of this compound occurs in the presence of SOD, whose activity can be indirectly assayed spectrophotometrically at 420 nm. A calibration curve was performed with purified SOD as standard. A 50% inhibition of pyrogallol autoxidation is defined as one unit of SOD and the specific activity was expressed as SOD units per mg of protein.

Glutathione peroxidase (GPx)

GPx activity was measured by the method of Wendel [26] except for the concentration of reduced b-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate NADPH, which was adjusted to 0.1 mM after previous tests had been performed in our laboratory. Tert-butylhydroperoxide was used as substrate. NADPH disappearance was continuously monitored with a spectrophotometer at 340 nm for 4 min. One GPx unit is defined as 1 mmol of NADPH consumed per minute, and specific activity is reported as units per milligram of protein.

Protein determination

Protein concentrations were determined by the method of Lowry [27], using serum bovine albumin as the standard.

Statistical analysis

Data were analyzed by the Student t test (for unpaired samples) or by two-way ANOVA. When appropriate, comparison between means was analyzed by the Tukey test when the F value was significant. The correlation between some parameters was estimated using Pearson's correlation test when necessary. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC compatible computer. Values of $p < 0.05$ were considered to be significant.

Results

The effect of treatments on the generation of reactive species was evaluated by DCFH oxidation. Two-way ANOVA showed a significant interaction between sarcosine and creatine plus pyruvate [$F(1,26) = 13.86$; $p < 0.01$]. These results showed that acute administration of sarcosine increased reactive species formation and co-administration of creatine plus pyruvate prevented this increase (Fig. 1a).

Lipid peroxidation was investigated by measuring TBA-RS levels in rat cerebral cortex homogenates after acute administration of sarcosine. Sarcosine administration increased TBARS levels in the cerebral cortex and a significant interaction between sarcosine and creatine plus pyruvate [$F(1,26) = 9.49$; $p < 0.05$], suggesting that co-administration of creatine plus pyruvate prevented the lipid peroxidation. The results demonstrate that acute administration of sarcosine may promote lipid peroxidation in cerebral cortex of rats (Fig. 1b).

Next, our results showed that sulfhydryl content was significantly reduced in cerebral cortex by sarcosine [$F(1,26) = 9.92$; $p < 0.01$]. Two-way ANOVA showed significant interaction between sarcosine and creatine plus pyruvate [$F(1,26) = 5.22$; $p < 0.05$] and that co-administration of creatine plus pyruvate prevented this reduction suggesting alteration of the redox state (Fig. 1c).

The activities of the enzymes SOD and GPx were assayed after the administration of sarcosine. GPx activity was decreased in cerebral cortex [$F(1,26) = 8.40$; $p < 0.01$] by sarcosine. The significant interaction between sarcosine and creatine plus pyruvate suggested that the reduction of GPx activity in cerebral cortex was prevented by the co-administration of creatine plus pyruvate [$F(1,26) = 16.38$; $p < 0.01$] (Fig. 2a). Moreover, sarcosine markedly increased SOD activity in cerebral cortex of rats [$F(1,27) = 19.97$; $p < 0.001$] and a significant interaction between sarcosine and creatine plus pyruvate suggesting that co-administration of sarcosine and pyruvate was effective to prevent this increase (Fig. 2b).

After, we evaluated sarcosine effects on the activities of hexokinase, GAPDH, PK, AK and CK, enzymes of the phosphoryltransfer network. The activity of hexokinase did not alter by acute administration of sarcosine. Moreover, PK and Na⁺-K⁺-ATPase activities were not modified by sarcosine administration (Tab. 1).

The significant interaction between sarcosine and creatine plus pyruvate suggested that the reduction of GAPDH activity in cerebral cortex was prevented by the co-administration of creatine plus pyruvate [F(1,26) = 5.07; p<0.05] (Fig. 3a). In respect to AK activity, two-way ANOVA showed significant interaction between sarcosine and creatine plus pyruvate [F(1,26) = 5.37; p<0.05] and Tukey test indicated that sarcosine administration significantly reduced AK activity and creatine plus pyruvate prevented the AK inhibition (Fig. 3b). Sarcosine acute administration decreased cytosolic and mitochondrial CK activities in cerebral cortex of rats. Two-way ANOVA showed a significant interaction between sarcosine and creatine plus pyruvate for cytosolic CK activity [F(1,27) = 5.45; p<0.05], and Tukey test indicated that sarcosine administration significantly reduced cytosolic CK activity, and that creatine plus pyruvate prevented this inhibition (Fig. 4a). Sarcosine administration reduced the mitochondrial CK activity in cerebral cortex [F(1,26) = 13.85; p<0.001] and co-administration of creatine plus pyruvate prevented the inhibition caused by sarcosine (Fig. 4b).

Finally, we investigated the effect of sarcosine administration on the respiratory chain enzyme activities in an attempt to elucidate whether the respiratory chain activity could be altered by sarcosinemia. We found that complex II and complex II-III were not altered by the treatment. However, sarcosine significantly reduced the activity of complex IV [t(11)=2.36; p<0.05] but enhanced of SDH activity (Tab. 1). Figure 6 shows the Pearson Correlations between some parameters of oxidative stress and energy metabolism in cerebral cortex from Wistar rats. Fig. 6a interesting shows that there is a negative correlation between GPx and DCF (r = 0.541; p<0.01) and Fig. 6b also shows a negative correlation between sulfhydryls content and cytosolic CK activity (r = 0.428; p<0.05). However, Fig. 6c interesting shows that there is a positive correlation between mitochondrial CK and AK activities (r = 0.576; p<0.01). These results strengthened the participation of oxidative stress and energy metabolism, especially the enzymes of the phosphoryltransfer network, in the effects provoked by sarcosine administration.

Discussion

Sarcosine is an N-methyl derivative of the amino acid glycine and a competitive inhibitor of the type I glycine transporter (GlyT1) [1]. This amino acid is a key intermediate of 1-carbon metabolism, and its elevation in blood and urine could reflect a deficient pool size of activated 1-carbon units [28, 29]. Sarcosinemia is a relatively rare autosomal recessive disorder that has a varied phenotypic presentation and is associated with mental retardation, and involvement of the central nervous system [5]. Considering that the mechanisms of brain damage in this disorder are poorly known, in this study, we investigated the acute administration of sarcosine on the energy metabolism and some parameters of oxidative stress in cerebral cortex from 21-day-old Wistar rats. Besides, we investigated the effects of possible preventive effects of creatine plus pyruvate on these parameters.

Acute administration of sarcosine on lipid and protein oxidation in cerebral cortex of rats was investigated. TBA-RS reflects the content of malondialdehyde, the most abundant individual aldehyde resulting from lipid peroxidation [30]. We have demonstrated that sarcosine is able to increase TBA-RS levels and suggest that oxidative damage to lipids has occurred. The co-administration of creatine plus pyruvate prevented the lipoperoxidation induced by sarcosine administration in the cerebral cortex. Lipid peroxidation is a known mechanism that causes alterations in the structure of cell membranes resulting in changes in structure and cell permeability [31]. Thus, we may speculate that this compound could provoke a loss of ion selectivity and the release of organelles contents, such as hydrolytic enzymes, lysosomes, and formation of cytotoxic products, culminating in cell death [32].

We observed an increase in the generation of reactive species by DCFH oxidation in cerebral cortex of rats, suggesting that sarcosine provokes increase of reactive species generation [8]. The co-administration of creatine plus pyruvate prevented the increase induced by sarcosine administration in the cerebral cortex. Moreover, a negative correlation between DCF content and GPx was observed, indicating that the increase in the production of reactive species may be due to the influence of the changes found in the activity of this enzyme (Fig.

6a). Since SOD metabolizes the superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) to hydrogen peroxide (H_2O_2) and GPx converts H_2O_2 to water, the consequence of the increase of SOD might be the more availability of H_2O_2 which can form the most potent pro-oxidant molecule, hydroxyl radical, by Fenton reaction as displayed in Fig. 5 [8]. On the other hand, the total sulfhydryl content was diminished by sarcosine administration and prevented by sarcosine or creatine plus pyruvate administrations, suggesting that protein oxidation was affected. The effect of sarcosine on SOD and GPx was also evaluated. SOD catalyses the dismutation of superoxide radical, and GPx removes organic hydroperoxides as well as hydrogen peroxide [8, 10]. The acute administration of sarcosine increased SOD activity which may suggest a higher superoxide radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) production and the co-administration of creatine plus pyruvate prevented the increase of SOD activity in the cerebral cortex. Moreover, decreasing antioxidant system could cause the accumulation of H_2O_2 or products of its decomposition and of $\text{O}_2^{\cdot-}$ [10]. In this context, our group showed that sarcosine was able to increase the activity of GPx, probably because the accumulation of H_2O_2 was able to stimulate this enzyme and co-administration of creatine plus pyruvate prevented the increase of enzyme [33, 34]. However, it is feasible to speculate that sarcosine leads to H_2O_2 accumulation and that the antioxidant enzymes play an important role on redox status in this condition.

We evaluated the activity of some kinases important in phosphoryltransfer network and maintenance of energy balance: hexokinase, GAPDH, CK, AK and PK [35]. We also measured the activities of phosphoryltransfer network, Na^+, K^+ -ATPase activity and respiratory chain and in cerebral cortex of rats. Deficiency of these enzymes activities has been observed in some neurodegenerative diseases and patients with creatine deficiency syndromes presenting symptoms similar to those observed in patients affected by other inborn errors [36-38]. The hexokinase activity was not altered by sarcosine in cerebral cortex of rats. On the other hand, GAPDH activity was reduced by sarcosine administration and the mechanisms of this inhibition can involve oxidation or S-thiolation of critical active site thiol groups [34].

Coupling of spatially separated intracellular ATP-producing and ATP-consuming is a fundamental process to the function of living organisms. However, the spatial arrangements are insufficient for all cellular energetic needs [40]. Therefore, it is necessary an enzymatic network, catalyzed by CK, AK, and glycolytic enzymes, in especial PK, to support high-energy

phosphoryl transfer between ATP-generating and ATP-consuming processes [35, 41, 42]. This dynamic metabolic signaling maintains the balance between cellular ATP consumption and production, the energetic homeostasis for preserving cell survival [12, 41]. Enzymatic capacities, isoform distribution, and the dynamics of net phosphoryl flux through the integrated phosphoryl transfer systems maintain the cellular energetic homeostasis [12]. We observed that cytosolic and mitochondrial CK activities and AK activity were inhibited by sarcosine administration [43]. Considering that some enzymes involved in energy metabolism require sulfhydryl groups and that sarcosine can also induce oxidative stress in cerebral cortex of rats (Fig. 5), a scenario regarding the effect of sarcosine in decreasing enzyme activities in the cell may result in the decreased availability of ATP, which can eventually lead to the accumulation of debris and ultimately cell death by oxidative stress [44].

The imbalance observed between sulfhydryls content and cytosolic CK activity was checked by Pearson's correlation (Fig. 6b). We also observed that co-administration of creatine plus pyruvate prevented the alteration of the mitochondrial and cytosolic CK activities. Creatine plus pyruvate co-administration was sufficient to prevent the alterations caused by sarcosine administration on mitochondrial CK activity, although mitochondrion is the main source of free radicals generation [45]. This network contributes to efficient intracellular energetic communication, maintaining the balance between cellular ATP consumption and production preserving cell phenotype and survival under stress [8, 23, 46]. Therefore, it is possible to hypothesize that oxidative stress and deficient phosphoryltransfer network may impair brain energy homeostasis altering brain functioning.

The increase in reactive species generation promoted by sarcosine can alter groups that are essential for enzymatic activity of PK, AK, BB-CK, and Mi-CK, such as sulfhydryl groups, or components of the plasma membrane, where enzymes are anchored [35]. Creatine, a nitrogenous guanidine compound, plays a central role in energy provision through a reaction catalyzed by creatine kinase [47]. It has also been shown that creatine presents antioxidant properties per se and clinical studies demonstrate that creatine supplementation has a marked neuroprotective effect on neurodegenerative diseases [48-50]. Pyruvate, an energy substrate, is also considered as a powerful antioxidant and neuroprotective agent [51-53]. Pyruvate protects neuronal damage caused by hydrogen peroxide [54], providing simultaneous resistance to

oxidative stress and mitochondrial insult [55]. Pyruvate plays a key role in intermediary metabolism as an intermediary product of glycolysis and the starting substrate for the tricarboxylic acid (TCA) cycle. Besides, scavenging of H₂O₂ by endogenously generated pyruvate is probably a key cellular defense against oxidative stress, particularly in proliferating cells [56]. Pyruvate protects cells from oxidative stress and mitochondrial insult because of its ability to serve as an effective neuronal energy substrate from glycolysis and to act as an exceptionally powerful antioxidant [57-60]. Our results showed that PK activity was not altered by sarcosine and/or creatine plus pyruvate in cerebral cortex.

The activity of Na⁺,K⁺-ATPase was not altered in cerebral cortex of rats subjected to sarcosine treatment, as well as the activities of complex II and II-III. On the other hand, we have demonstrated that sarcosine was able to increase succinate dehydrogenase activity and inhibit the activity of complex IV, suggesting that the mitochondrial respiratory chain was altered in cerebral cortex of rats. Reduction of the electron transport chain flow (impaired oxidative phosphorylation) implies lower ATP production to sustain energy needs of the cells.

One possible mechanism could be the direct interaction between sarcosine and the enzymes. On the other hand, other mechanism for the effects of sarcosine on the enzymes studied could be the induction of oxidative stress mainly in mitochondria, the main site of free radicals production [45]. In fact, sulfhydryl groups of GAPDH, AK, BB-CK, and Mi-CK are highly susceptible to reactive oxygen and nitrogen species [61] induced by oxidizing agents. Moreover, methylation of the enzymes could occur, since oxidative demethylation to of sarcosine to glycine occurs primarily in the liver resulting in the formation of the active 1-carbon fragment 5,10-methylenetetrahydrofolate. Sarcosine could also induces the formation of adducts with the products of lipoperoxidation, mainly 4-hydroxy-2- nonenal [62].

In summary, in this study we demonstrated that sarcosine induces oxidative stress and alters parameters of phosphoryl transfer network in cerebral cortex of rats. Moreover, co-administration of creatine and pyruvate was able to prevent some harmful effects of sarcosine on some parameters of oxidative stress and energy metabolism. Further experiments performed *in vivo* should be carried out to confirm these results. If similar findings were achieved in humans, it is feasible to propose that administration of antioxidants, such as creatine plus

pyruvate, should be considered as a potential adjuvant therapy for patients affected by sarcosinemia.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS, RS-Brazil) and Programa de Núcleos de Excelência-Financiadora de Estudos e Projetos (PRONEX II, FINEP-CNPq-Brazil). Figure 5 was produced using Servier Medical Art (www.servier.com).

References

1. Gerritsen T, Waisman HA (1966) Hypersarcosinemia: an inborn error of metabolism. *N Engl J Med* 275:66-9
2. Bergeron F, Otto A, Blache P, Day R, Denoroy L, Brandsch R, Bataille D (1998) Molecular cloning and tissue distribution of rat sarcosine dehydrogenase. *Eur J Biochem* 257:556-561
3. Scott CR (2001) Sarcosinemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th edn. McGraw-Hill Companies, New York, pp 2057-2063
4. Socala K, Nieoczym D, Rundfeldt C, Wlaz P (2010) Effects of sarcosine, a glycine transporter type 1 inhibitor, in two mouse seizure models. *Pharmacol Rep* 62:392-397
5. Stahl SM (2007) Beyond the dopamine hypothesis to the NMDA glutamate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *CNS Spectr* 12:265–268
6. Javitt DC (2009) Glycine transport inhibitors for the treatment of schizophrenia: symptom

and disease modification. *Curr Opin Drug Discov Devel* 12:468–478

7. Shim SS, Hammonds MD, Kee BS (2008) Potentiation of the NMDA receptor in the treatment of schizophrenia: focused on the glycine site. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 258:16–27
8. Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) Measurement of reactive species. In: Halliwell B, Gutteridge JMC (eds) *Free radicals in biology and medicine*, 4th edn. Oxford University Press, Oxford, pp 268–340
9. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44–84
10. Diplock AT (1994) Antioxidants and free radical scavengers. In: Rice-Evans CA, Burdon RH (eds) *Free radical damage and its control*, 1st edn. Elsevier, Amsterdam, pp 113–130
11. Gemelli T, Andrade RB, Rojas DB et al (2013) In vitro and in vivo effects of β -alanine on some parameters of oxidative stress in cerebral cortex and cerebellum of rats. *Mol Cell Biochem* 380:161–170
12. Dzeja PP (2003) Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J Exp Biol* 206:2039–2047
13. Busanello E, Viegas C, Moura A, Tonin A, Grings M, Vargas C et al (2010) In vitro evidence that phytanic acid compromises Na(+), K(+)-ATPase activity and the electron flow through the respiratory chain in brain cortex from young rats. *Brain Res* 1352 (2010) 231–238 Doi:10.1016/j.brainres.2010.07.012
14. de Andrade RB, Gemelli T, Rojas DB, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM (2015) Chemically induced acute model of sarcosinemia in wistar rats. *Metab Brain Dis* Nov 12 (2015) [Epub ahead of print]
15. Da-Silva WS, Gómez-Puyou A, de Gómez-Puyou MT et al (2004) Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense: steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in

- mitochondria. *J Biol Chem* 279:39846–55
16. Mazzola JL, Sirover MA (2005) Aging of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is dependent on its subcellular localization. *Biochim Biophys Acta* 1722:168–74
 17. Leong SF, Lai JC, Lim L et al (1981) Energy-metabolising enzymes in brain regions of adult and aging rats. *J Neurochem* 36:1548–56
 18. Dzeja PP, Vitkevicius KT, Redfield MM et al (1999) Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium: increased contribution in heart failure. *Circ Res* 84:1137–43
 19. Huges BP (1962) A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase. *Clin Chim Acta* 7:597–603
 20. Fischer J, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM et al (1985) Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 153:23–36
 21. Rustin P, Chretien D, Bourgeon T, et al (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 228:35–51
 22. Sorensen RG, Mahler HR (1982) Localization of endogenous ATPases at the nerve terminal. *J Bioenerg Biomembranes* 14:527–547
 23. Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302:141–145
 24. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy BS (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5:227–31
 25. Marklund SL (1985) Pyrogallol autoxidation. In: Greenwald RA (eds) *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press Inc, Boca Raton, 1985, pp 243–7

26. Wendel A (1981) Glutathione peroxidase *Methods Enzymol* 77:325–33
27. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–267
28. Deutsch SI, Rosse RB, Long KD, Gaskins B, Mastropaolo J (2006) Rare neurodevelopmental abnormalities of sarcosinemia may involve glycinergic stimulation of a primed N-methyl-d-aspartate receptor. *Clin Neuropharmacol* 29:361-3
29. Zhang HX, Hyrc K, Thio LL (2009) The glycine transport inhibitor sarcosine is an NMDA receptor co-agonist that differs from glycine. *J Physiol* 587:3207–3220
30. Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186:407–421
31. Tappel AL (1973) Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed Proc* 32:1870–1874
32. Hershko C (1989) Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Semin Hematol* 26:277–285
33. Kono Y, Fridovich I (1982) Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 257:5751–5754
34. Penz J, Gemelli T, Carvalho CAS, Guerra RB, Olibone L, Salvador M, Dani D, Araújo AS, Funchal C (2009) Effect of 3-butyl-1-phenyl-2-(phenyltelluro)oct-en-1-one on oxidative stress in cerebral cortex of rats. *Food Chem Toxicol* 47:745–751
35. Knight RJ, Kofoed KF, Schelbert HR, Buxton DB (1996) Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in post-ischaemic myocardium. *Cardiovasc Res* 32:1016-23
36. Saks VA, Khuchua ZA, Vasilyeva EV, Belikova O, Kuznetsov AV (1994) Metabolic compartmentation and substrate channelling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases in in vivo regulation of cellular respiration--a synthesis. *Mol Cell Biochem* 134:155-192

37. De Andrade RB, Gemelli T, Rojas DB et al (2014) 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* 51:1184-94
38. Rojas DB, de Andrade RB, Gemelli T et al (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* 27:595–603
39. Béard E, Braissant O (2010) Synthesis and transport of creatine in the CNS: importance for cerebral functions. *J Neurochem* 115: 297–313
40. Dzeja PP, Redfield MM, Burnett JC, Terzic A (2000) Failing energetics in failing hearts. *Curr Cardiol Rep* 2:212–217
41. 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
42. Dzeja PP, Terzic A (1998) Phosphotransfer reactions in the regulation of ATP-sensitive K⁺ channels. *Faseb J* 12:523–529
43. Dzeja PP, Bortolon R, Perez-Terzic C, Holmuhamedov EL, Terzic A (2002) Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer. *PNAS* 99:10156–10161
44. Chen X, Guo C and Kong J (2012) Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res* 15:376-385
45. Sas K, Robotka H, Toldi J, Vécsei L (2007) Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J Neurol Sci* 257:221-239
46. 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

47. Schulze A (2003) Creatine deficiency syndromes. *Mol Cell Biochem* 244:143–150
48. Sestili P, Martinelli C, Bravi G et al (2006) Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 40:837–849
49. Tarnopolsky MA (2007) Clinical use of creatine in neuromuscular and neurometabolic disorders. *Subcell Biochem* 46:183–204
50. 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
51. Ryou MG, Liu R, Ren M, Sun J, Mallet RT, Yang SH (2012) Pyruvate protects the brain against ischemia–reperfusion injury by activating the erythropoietin signaling pathway. *Stroke* 43:1101–1107
52. Ullah N, Naseer MI, Ullah I, Lee HY, Koh PO, Kim MO (2011) Protective effect of pyruvate against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *Neuropharmacology* 61:1248–1255
53. Giandomenico AR, Cerniglia GE, Biaglow JE, Stevens CW, Koch CJ (1997) The importance of sodium pyruvate in assessing damage produced by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 23:426–434
54. Jagtap JC, Chandele A, Chopde BA, Shastry P (2003) Sodium pyruvate protects against H₂O₂ mediated apoptosis in human neuroblastoma cell line-SK-N-MC. *J Chem Neuroanat* 26:109–118
55. Mazzi 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
56. Brand K (1997) Aerobic glycolysis by proliferating cells: protection against oxidative stress at the expense of energy yield. *J Bioenerg Biomembr* 29:355–364

57. Andrae U, Singh J, Ziegler-Skylakakis K (1985) Pyruvate and related α -ketoacids protect mammalian cells in culture against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *Toxicol Lett* 28:93–98
58. Kitamura Y, Ota T, Matsuoka Y, Tooyama I, Kimura H, Shimohama S, Normura Y, Gebicke-Haerter PJ, Taniguchi T (1999) Hydrogen peroxide induced apoptosis mediated by p53 protein in glial cells. *Glia* 25:154–164
59. Palomba L, Sestili P, Columbaro M, Falcieri E, Cantoni O (1999) Apoptosis and necrosis following exposure of U937 cells to increasing concentrations of hydrogen peroxide: the effect of the poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor 3-aminobenzamide. *Biochem Pharmacol* 58:1743–1750
60. Mazzi 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
61. Yufu K, Itoh T, Edamatsu R, Mori A, Hirakawa M (1993) Effect of hyperbaric oxygenation on the Na^+ , K^+ -ATPase and membrane fluidity of cerebrocortical membranes after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurochemical Research* 9:1033–1039
62. Reznick AZ, Packer L (1994) Oxidative damage of proteins: spectrophotometer for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233:357–363

Legend to Figures

Fig. 1 Effect of acute sarcosine administration on DCFH oxidation (A), TBARS (B) and total sulfhydryls (C) in cerebral cortex of rats. Data from DCFH oxidation are expressed as nmol of DCF (2',7'-dihydrodichlorofluorescein) formed per mg of protein; data from TBARS (thiobarbituric acid reactive species) are expressed as nmol of TBARS formed per mg of protein; data from total sulfhydryls are expressed as nmol of TNB (thionitrobenzoic acid) per mg of protein. Data are expressed as mean±SD for seven independent experiments performed in triplicate. Sarcosine (0.5 µmol/g body weight by subcutaneous administration), Cre (creatine) (0.4 µmol/g), Pyr (pyruvate) (0.2 µmol/g), in which saline solution and creatine plus pyruvate were administered i.p.). *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 compared to the other groups (two-way ANOVA followed by the Tukey test)

Fig. 2 Effect of acute sarcosine administration on GPX (A) and SOD (B) activities in cerebral cortex of rats. Data from GPX (glutathione peroxidase) are expressed as µmol of NADPH consumed per minute per mg of protein; data from SOD (superoxide dismutase) are expressed as units of SOD per mg of protein. Data are expressed as mean±SD for seven independent experiments performed in triplicate. Sarcosine (0.5 µmol/g body weight by subcutaneous administration), Cre (creatine) (0.4 µmol/g), Pyr (pyruvate) (0.2 µmol/g), in which saline solution and creatine plus pyruvate were administered i.p.). **p<0.01; ***p<0.001 compared to the other groups (two-way ANOVA followed by the Tukey test)

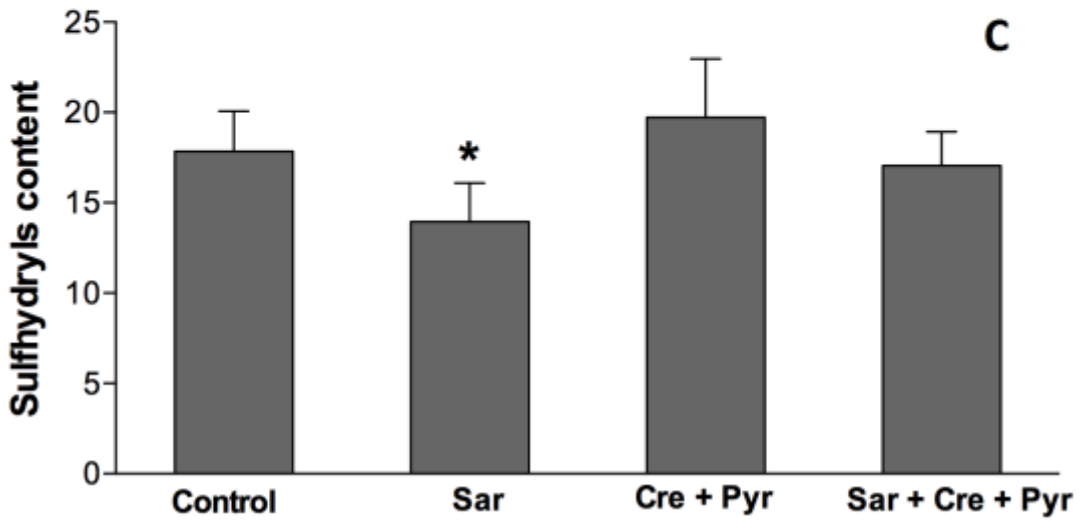
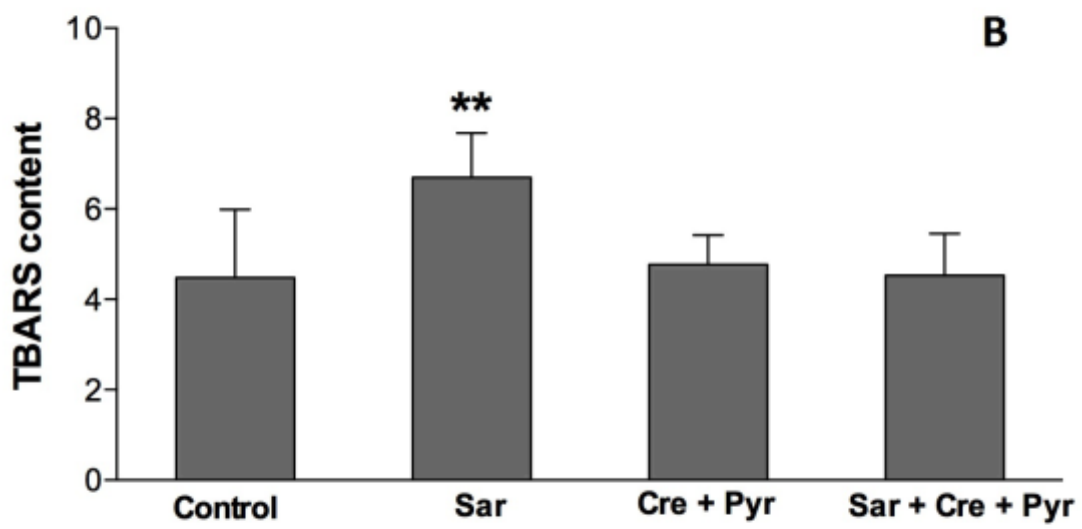
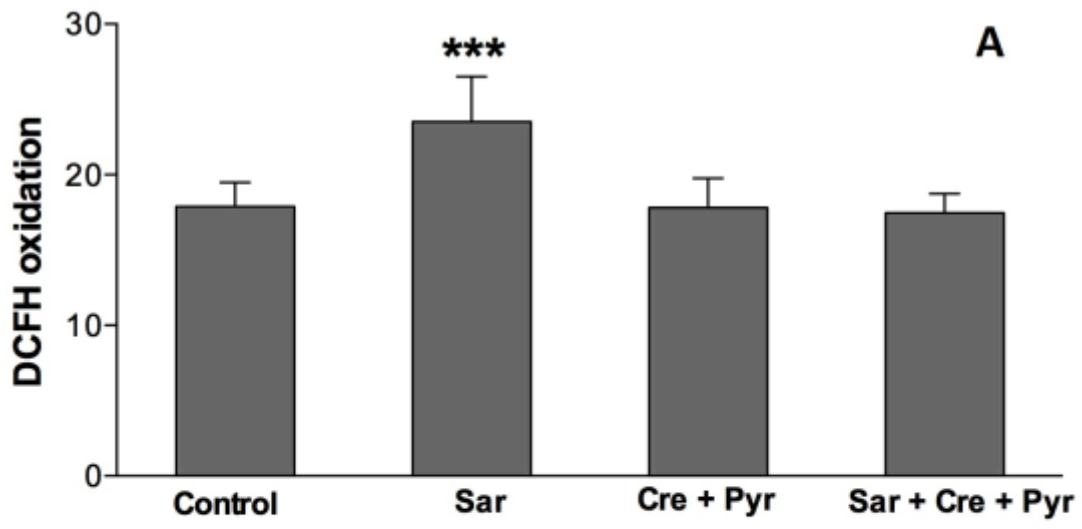
Fig. 3 Effect of acute administration of sarcosine on the activities of the enzymes GAPDH (A) and AK (B) in cerebral cortex of rats. Results of hexokinase and GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) activities are expressed as µmol of NADH per min per mg of protein;

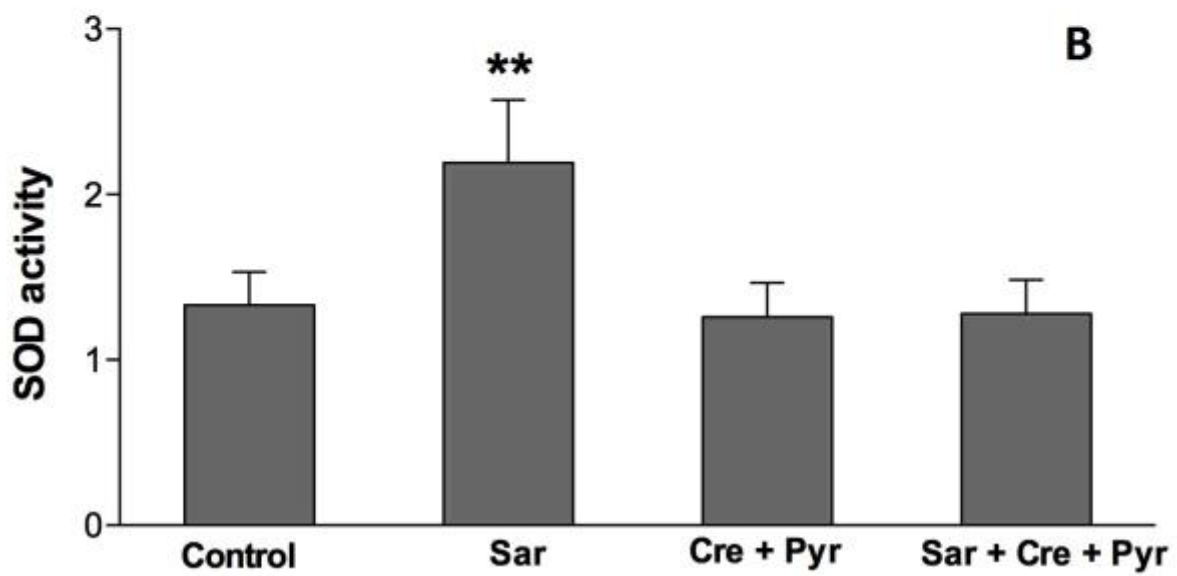
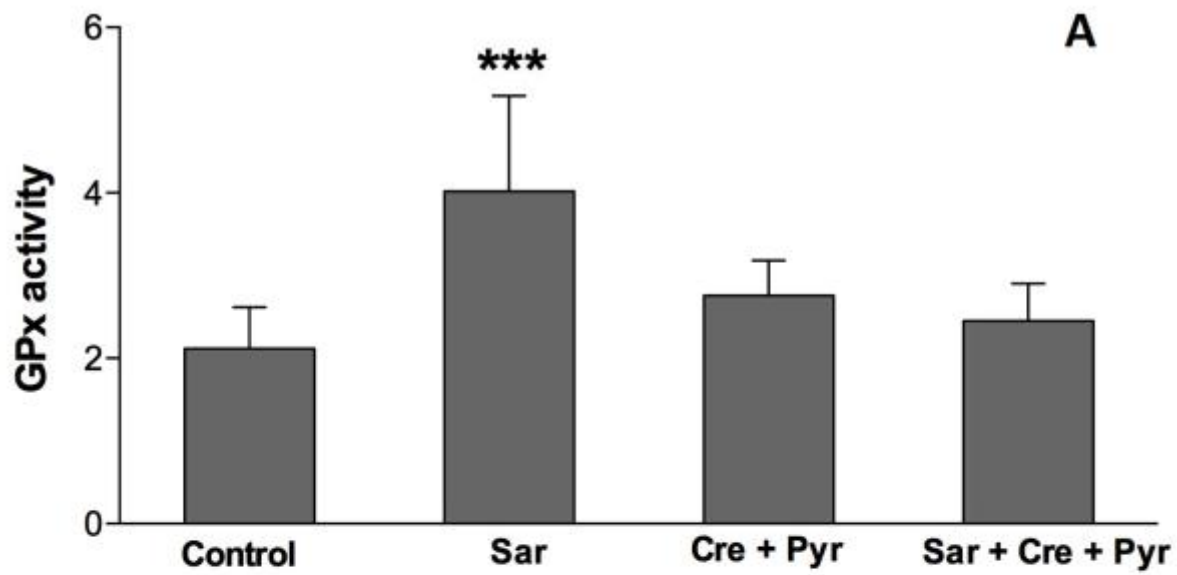
data from AK are expressed as μmol of ATP per min per mg of protein. Data are expressed as mean \pm SD for seven independent experiments performed in triplicate. Sarcosine (0.5 $\mu\text{mol/g}$ body weight by subcutaneous administration), Cre (creatine) (0.4 $\mu\text{mol/g}$), Pyr (pyruvate) (0.2 $\mu\text{mol/g}$), in which saline solution and creatine plus pyruvate were administered i.p.). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared to the other groups (two-way ANOVA followed by the Tukey test)

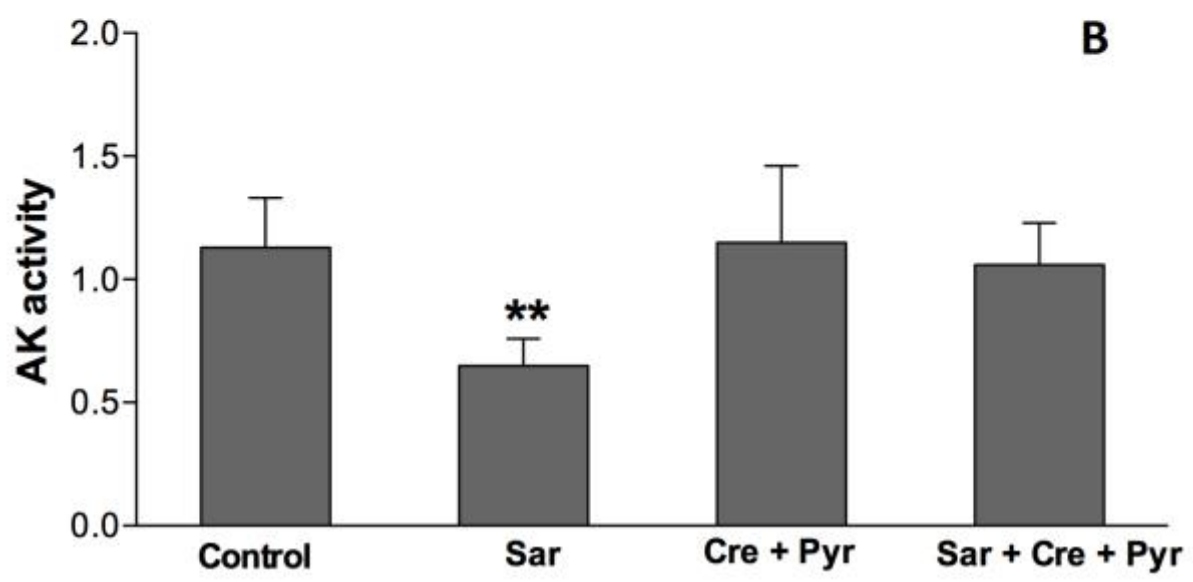
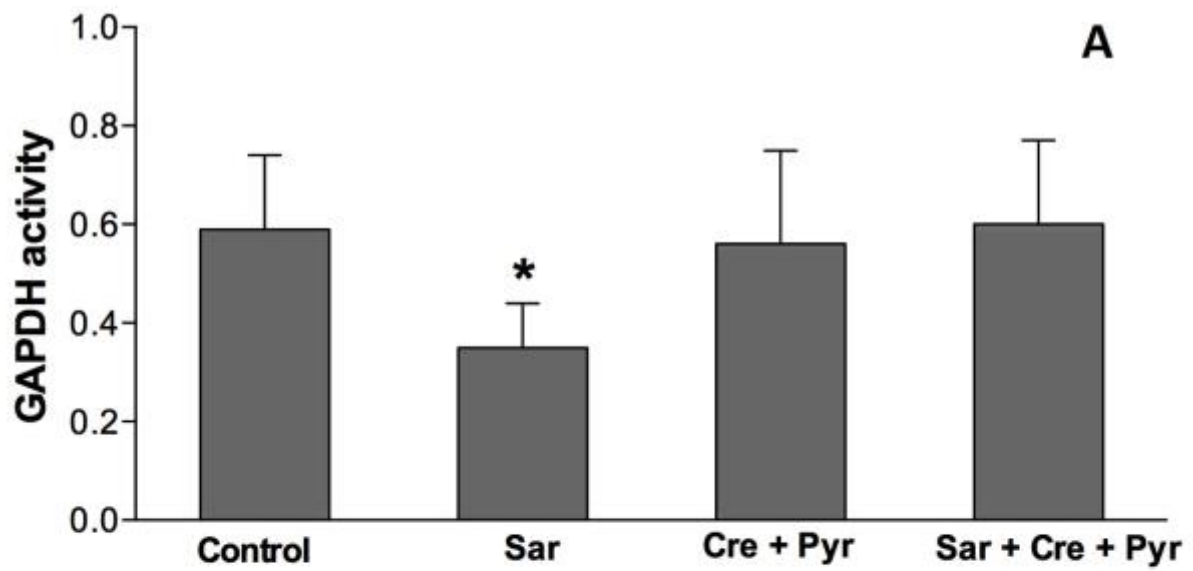
Fig. 4 Effect of acute sarcosine administration on cytosolic (A) and mitochondrial (B) CK activities in cerebral cortex of rats. Results are expressed as μmol of creatine per minute per mg of protein. Data are expressed as mean \pm SD for seven independent experiments performed in triplicate. Sarcosine (0.5 $\mu\text{mol/g}$ body weight by subcutaneous administration), Cre (creatine) (0.4 $\mu\text{mol/g}$), Pyr (pyruvate) (0.2 $\mu\text{mol/g}$), in which saline solution and creatine plus pyruvate were administered i.p.). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ compared to the other groups (two-way ANOVA followed by the Tukey test)

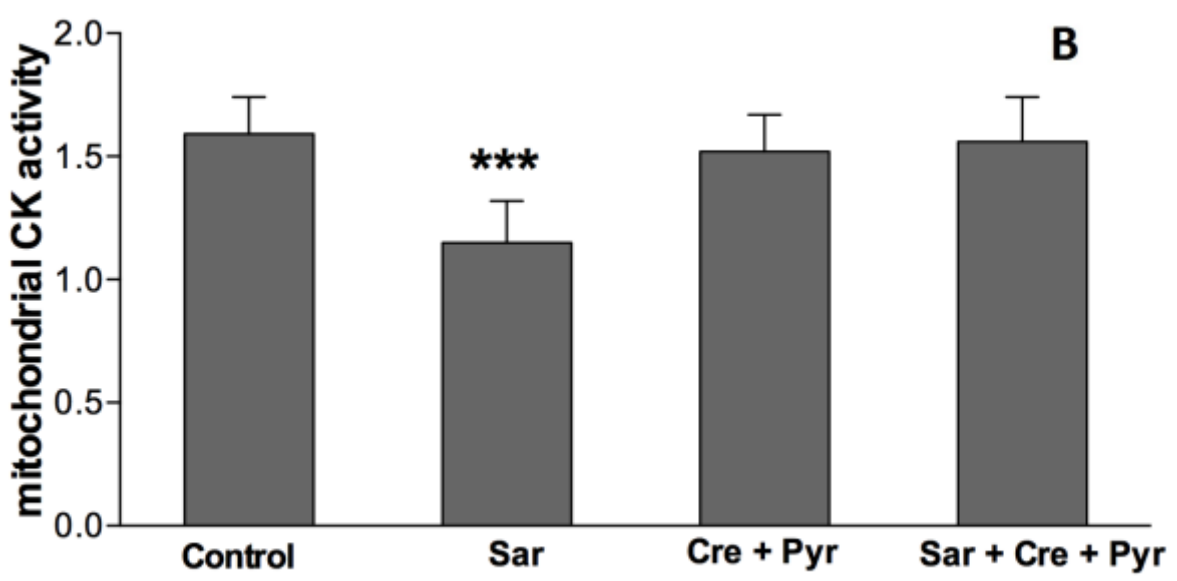
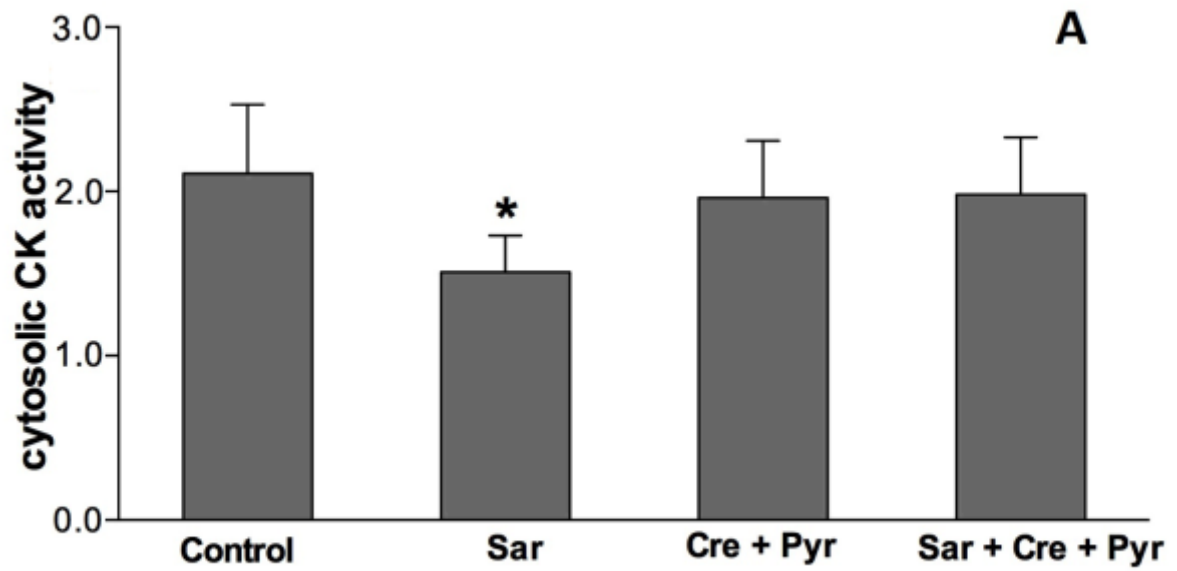
Fig. 5 Summary of the possible mechanisms triggered by oxidative stress on inhibition of enzymes of energy metabolism by sarcosine discussed in the text. The figure was produced using Servier Medical Art (www.servier.com)

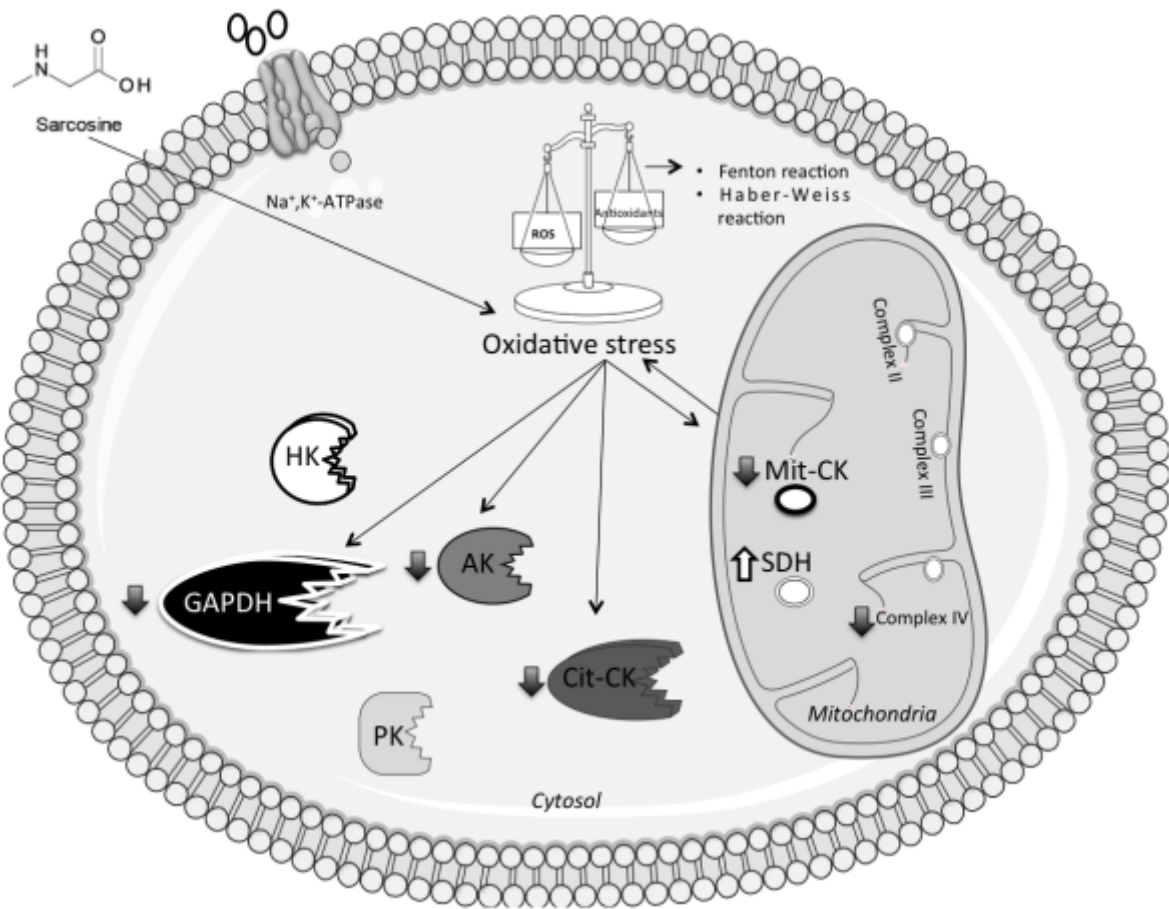
Fig. 6 Correlation between GPx activity and reactive species production (A), sulfhydryls content and cytosolic CK activity (B) and mitochondrial CK activity and AK activity. Data are expressed as mean \pm SD for seven independent experiments performed in triplicate. Sarcosine (0.5 $\mu\text{mol/g}$ body weight by subcutaneous administration), Cre (creatine) (0.4 $\mu\text{mol/g}$), Pyr (pyruvate) (0.2 $\mu\text{mol/g}$), in which saline solution and creatine plus pyruvate were administered i.p.). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ compared to the other groups (two-way ANOVA followed by the Tukey test)

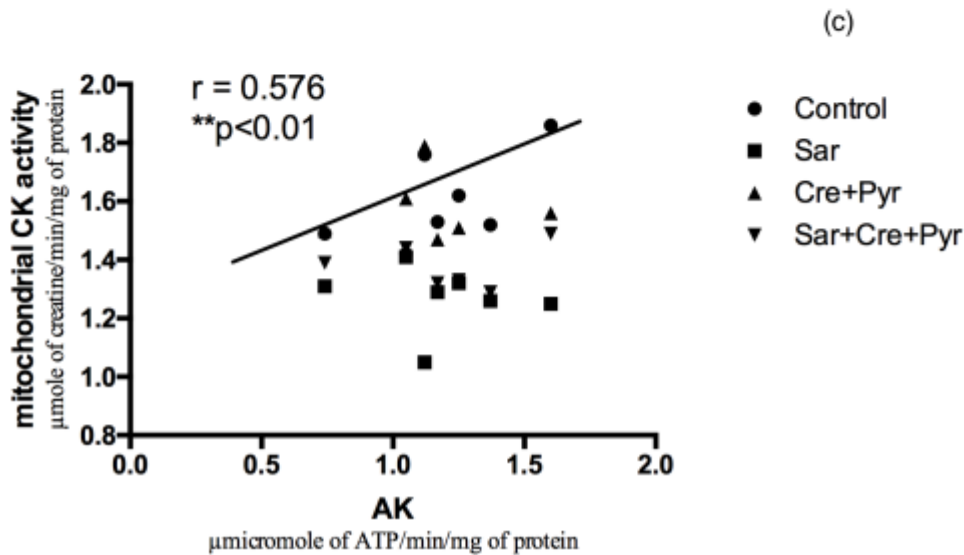
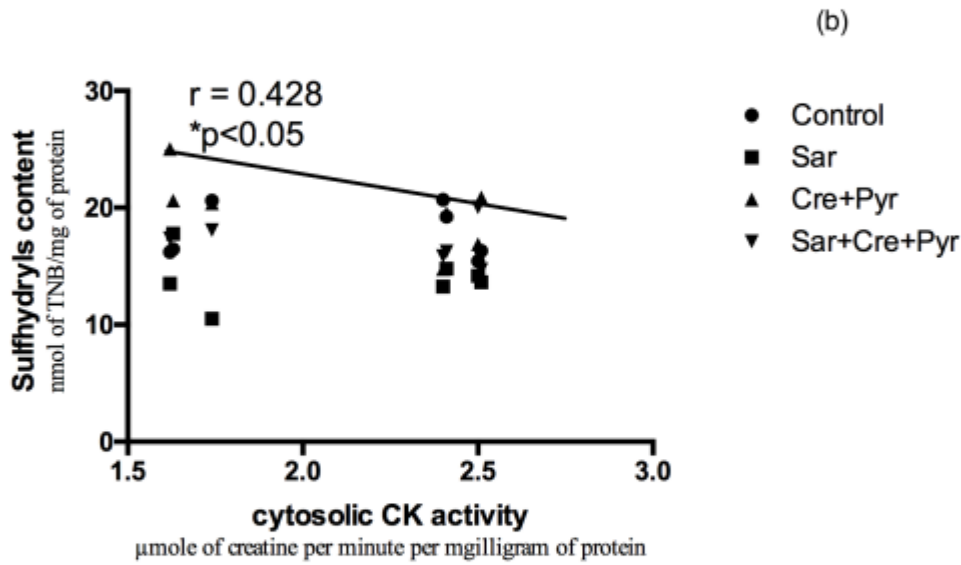
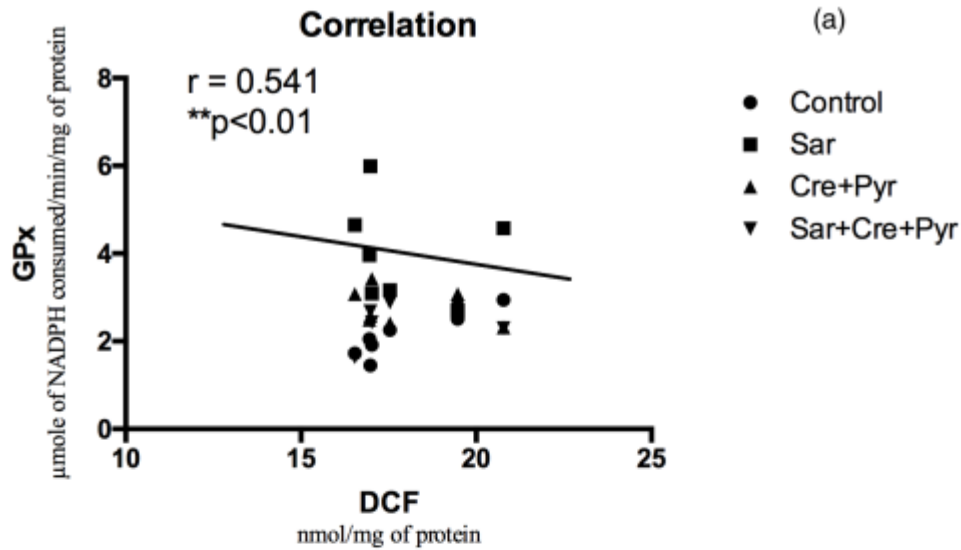












PARTE III
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

III. 1. DISCUSSÃO

Primeiramente, discutiremos os resultados da Parte I deste trabalho como segue.

Em geral, os diferentes períodos de desenvolvimento em humanos e ratos seguem o mesmo perfil. A concordância entre as mudanças comportamentais e estruturais em humanos e ratos expostos para os mesmos neurotóxicos no desenvolvimento é, em muitos casos, extremamente alta (Schardein 1998). Nos seres humanos, boa parte do desenvolvimento cerebral está finalizado antes do nascimento, enquanto em ratos começa após o nascimento e dura até vigésimo primeiro dia pós-parto. Dessa forma, essas diferenças têm implicações importantes para a correlação dos resultados obtidos em estudos com ratos para avaliação dos riscos para os humanos (Himwich 1973). Apesar da diferença na sensibilidade e na variabilidade interindividual, os dados de origem animal provenientes de desenvolvimento experimental dos estudos de neurotoxicidade são considerados bons preditores para o risco no desenvolvimento em seres humanos.

Os modelos químicos em animais não são completamente semelhantes às doenças humanas em toda sua complexidade. No entanto, esses modelos têm sido utilizados em larga escala porque têm a vantagem de estudar cada substância conhecida e sugerir um controle mais adequado. Portanto, os modelos animais são importantes na investigação dos mecanismos fisiopatológicos das doenças, especialmente no metabolismo cerebral, ajudando a sugerir medidas preventivas e novas drogas para o tratamento (Skvorak 2009). Um modelo de sarcosinemia em camundongos com deficiência da sarcosina desidrogenase foi induzida pela mutagênese química (Harding et al, 1992). Esse modelo genético em rato é mais semelhante

com a condição humana do que o modelo induzido quimicamente de sarcosinemia. Contudo, o modelo estudado neste trabalho permite estudar o efeito isolado da sobrecarga de sarcosina. A sobrecarga não reproduz inteiramente a sarcosinemia, pois a enzima sarcosina desidrogenase é ativa nos ratos, aumentando a formação do fragmento ativo de 1-carbono 5,10- tetra-hidrofolato metileno, de forma diferente da doença humana. Dessa forma, o modelo químico desenvolvido no presente trabalho tem algumas limitações. Vários modelos químicos para ratos foram desenvolvidos no nosso laboratório como indicado antes. O objetivo primário dessa parte do trabalho foi administrar altos níveis de sarcosina no plasma e no cérebro desses roedores, semelhantes aos encontrados em pacientes com sarcosinemia, uma condição associada com elevados níveis plasmáticos e aumento da excreção urinária de sarcosina (N-metilglicina) (Gerritsen e Waisman 1966). Os resultados mostraram que as concentrações plasmáticas máximas de sarcosina foram alcançadas 30 minutos após o modelo agudo induzido de sarcosinemia em ratos, diminuindo gradualmente depois, embora essa concentração tenha continuado elevada durante mais de 3 h. A concentração de sarcosina cerebral foi máxima 60 minutos após a injeção e correspondeu a cerca de 4 vezes os valores normais. As concentrações de sarcosina no cérebro também diminuíram ao longo do tempo, mas mantiveram-se relativamente elevadas durante mais de 3 horas após a última injeção. Esses dados estão de acordo com relatórios anteriores, mostrando que sarcosina atravessa a BHE pelo sistema de transporte de glicina do tipo I/ (GlyT1), que é um transportador Na^+/Cl^- (Kracht et al 2003; O'Kane e Hawkins 2003; Scott, 2001).

A sarcosina ou N-metilglicina é um intermediário importante no metabolismo de um carbono (Ueland et al, 2007), um inibidor competitivo no transportador de glicina de tipo I (GlyT1) (Smith et al. 1992; Lopez-Corcuera et al. 1998; Herdon et al. 2001; Mallorga et al. 2003), e agonista do receptor de-metil-aspartato (NMDAR) (Zhang et al. 2009).

Os parâmetros farmacocinéticos tais como as concentrações plasmáticas máximas (C_{max}), o tempo de absorção máxima (T_{max}), a taxa de depuração (CL), a meia-vida biológica (T_{1/2}) e o grau de distribuição no corpo ou volume de distribuição aparente (V_d) são determinados a partir desses estudos (Ross e Gilman, 1990). Os ratos são usados como a espécie escolhida para esse trabalho principalmente por causa do seu tamanho e da facilidade de obtenção de amostras (Marzo, 1997).

Os parâmetros farmacocinéticos medidos após a administração da sarcosina mostraram que a depuração plasmática e o volume de distribuição aparente foram aumentados, além disso, o tempo de meia-vida plasmática foi diminuído de acordo com a idade dos animais. Esses dados sugerem que a excreção renal e o metabolismo hepático de sarcosina não estão totalmente desenvolvidos em ratos muito jovens. Além disso, observou-se que as concentrações de sarcosina no cérebro diminuíram mais lentamente do que no plasma, mantendo-se relativamente elevadas durante mais de 3 horas após a última injeção de sarcosina. No presente estudo, a sarcosina foi administrada durante um período de rápido desenvolvimento cerebral (7, 14 e 21 dias de vida) em que os eventos cruciais ocorrerem, tais como sinaptogênese (Clark et al, 1993), proliferação neuronal e mielogênese intensa (Enesco e Leblond, 1962; Winick and Noble, 1965). Esse modelo químico poderia ser adequado para mais estudos com o objetivo de demonstrar o efeito da alta concentração de sarcosina no cérebro.

Altas concentrações de sarcosina sobre os parâmetros neuroquímicos são necessárias para entender os resultados cerebrais que têm sido relatados em pacientes afetados por sarcosinemia. No entanto, deve ser levado em consideração que os metabólitos de sarcosina podem aumentar decorrentes da administração desse aminoácido de modo que os resultados obtidos a partir desse modelo devem ser interpretados com cautela.

A seguir, discutiremos os resultados da Parte II deste trabalho.

Considerando que os mecanismos de danos cerebrais desse transtorno são pouco conhecidos, foi investigada, nessa parte do estudo, a administração aguda de sarcosina sobre o metabolismo energético e de alguns parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos Wistar de 21 dias de idade. Além disso, foram investigados os possíveis efeitos preventivos da creatina mais piruvato sobre esses parâmetros.

A administração aguda de sarcosina sobre a oxidação de lipídeos e proteínas no córtex cerebral dos ratos foi investigada. TBARS reflete o conteúdo de malondialdeído, o aldeído mais abundante resultante da peroxidação lipídica (Esterbauer, 1990). Nós demonstramos que sarcosina é capaz de aumentar os níveis de TBARS e sugerem que os danos oxidativos em lipídeos tenham ocorrido. A co-administração de creatina mais piruvato impediu a lipoperoxidação induzida pela administração de sarcosina no córtex cerebral. A peroxidação lipídica é um mecanismo conhecido que provoca alterações na estrutura das membranas celulares, resultando em mudanças na estrutura e permeabilidade celular (Tappel, 1973). Assim, podemos especular que a sarcosina pode provocar uma alteração na seletividade iônica e liberação do conteúdos das organelas, tais como enzimas hidrolíticas, lisossomos e formação de produtos citotóxicos, culminando na morte celular (Hershko, 1989).

Observamos um aumento na geração de espécies reativas pela oxidação DCFH no córtex cerebral de ratos, o que sugere que sarcosina provoca aumento na geração de espécies reativas (Halliwell, 2007). A co-administração de creatina mais piruvato impediu o aumento na geração de espécies reativas induzido pela administração de sarcosina no córtex cerebral. Além disso, observamos uma correlação negativa entre o teor de DCF e GPx, indicando que o

aumento na produção de espécies reativas pode ser devido à influência das alterações encontradas na atividade dessa enzima. Uma vez que a SOD metaboliza o anião superóxido ($O_2^{\cdot -}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e GPx converte o H_2O_2 a água, a consequência do aumento da SOD pode ser a maior disponibilidade de H_2O_2 , que pode formar a mais potente molécula pró-oxidante, o radical hidroxil, pela reação de Fenton (Halliwell, 2007). Por outro lado, o conteúdo total de sulfidril foi diminuído pela administração de sarcosina e impedido pela administração de creatina mais piruvato, sugerindo que a oxidação da proteína foi afetada. Além disso, foi avaliado também o efeito de sarcosina sobre a SOD e GPx. A SOD catalisa a dismutação do radical superóxido, e a GPx remove hidroperóxidos orgânicos, bem como o peróxido de hidrogênio (Halliwell, 2007; Diplock, 1994). A administração aguda de sarcosina aumentou a atividade da SOD, o que pode sugerir uma maior produção do radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e a co-administração de creatina mais piruvato preveniu o aumento da atividade da SOD no córtex cerebral. Além disso, diminuindo esse sistema antioxidante, pode ocorrer a acumulação de H_2O_2 ou produtos da sua decomposição e de $O_2^{\cdot -}$ (Diplock, 1994). Nesse contexto, o nosso grupo mostrou que sarcosina foi capaz de aumentar a atividade da GPx, provavelmente devido a acumulação de H_2O_2 e foi capaz de estimulá-la, bem como a co-administração de creatina mais piruvato impediu o aumento da enzima (Kono, 1982; Penz, 2009). No entanto, é possível especular que sarcosina conduz à acumulação de H_2O_2 e que as enzimas antioxidantes desempenham um papel importante no estado redox nessa condição.

Avaliamos, também, a atividade de algumas cinases importantes na rede fosforiltransferência e manutenção do equilíbrio energético: hexocinase, GAPDH, CK, AK e PK (Knight, 1996). Nós dosamos as atividades da bomba Na^+, K^+ -ATPase e enzimas da cadeia respiratória no córtex cerebral de ratos. A deficiência na atividade dessas enzimas tem sido observada em algumas doenças neurodegenerativas e pacientes com síndromes de deficiência

de creatina, apresentando sintomas semelhantes aos observados em doentes afetados por outros Erros Inatos do Metabolismo (Saks, 1994; De Andrade et al, 2014; Rojas et al, 2012). A atividade da hexocinase não foi alterada pela sarcosina em córtex cerebral de ratos. Por outro lado, a atividade de GAPDH foi reduzida na administração de sarcosina e os mecanismos dessa inibição podem envolver a oxidação ou S-tioação de grupos tíois ativos em local críticos (Penz et al, 2009). Acoplamento de sítios de produção e consumo de ATP intracelular é um processo fundamental para a função de organismos vivos. No entanto, essas organizações são insuficientes para todas as necessidades energéticas celulares (Dzeja, 2000). Portanto, é necessária uma rede enzimática, catalisada pela CK, AK e enzimas glicolíticas, em especial a PK, para suportar a transferência de fosforil de alta energia entre o gerador de ATP e os processos que consomem ATP PK (Knight, 1996; Wallimann, 1992; Dzeja, 1998). Essa sinalização metabólica dinâmica mantém o equilíbrio entre o consumo e produção de ATP celular, sendo a homeostase energética para preservar a sobrevivência da célula (Dzeja, 2003; Wallimann, 1992). As capacidades enzimáticas, distribuição das isoformas enzimáticas e a dinâmica de fluxo de grupos fosforil através dos sistemas de fosforiltransferência integrada mantêm a homeostase energética celular (Dzeja, 2003). Observamos que as atividades da CK citosólica e mitocondrial, além da atividade da AK foram inibidas pela administração de sarcosina (Dzeja, 2002). Tendo em conta que algumas enzimas envolvidas no metabolismo energético possuem grupos sulfidrilas e que a sarcosina também pode induzir o estress oxidativo em córtex cerebral de ratos, uma relação ao efeito da sarcosina na diminuição das atividades das enzimas na célula pode resultar na disponibilidade diminuída de ATP, que pode eventualmente levar à acumulação de detritos e, finalmente, morte da célula por estress oxidativo (Chen, 2012).

O desequilíbrio observado entre o conteúdo de sulfidrilas e da atividade CK citosólica

foi verificada pela correlação de Pearson. Observamos também que a co-administração de creatina mais piruvato impediu a alteração das atividades da CK citosólica mitocondrial. Esses componentes foram suficientes para evitar que as alterações causadas pela administração de sarcosina na atividade da CK mitocondrial, embora a mitocôndria seja a principal fonte de geração de espécies reativas (Sas, 2007). Essa rede de fosforiltransferência intracelular contribui eficientemente para a comunicação energética, mantendo o equilíbrio entre o consumo e produção de ATP celular, preservando o fenótipo celular e sobrevivência sob estresse (Halliwell, 2007; Aksenov, 2001; Dzeja, 2009). Portanto, é possível levantar a hipótese de que o estresse oxidativo e a rede de fosforiltransferência podem prejudicar o cérebro na homeostase energética alterando o seu funcionamento.

O aumento da geração de espécies reativas promovido pela sarcosina pode alterar os grupos que são essenciais para a atividade enzimática da PK, AK, BB-CK, e Mi-CK, tais como grupos sulfidrilas ou componentes da membrana plasmáticas, em que as enzimas estão ancoradas (Knight, 1996). A creatina, um composto guanidínico, desempenha um papel central no fornecimento de energia por meio de uma reação catalisada pela CK (Schulze, 2003). Também foi demonstrado que a creatina apresenta propriedades antioxidantes *per se* e estudos clínicos demonstram que a suplementação com creatina tem um efeito neuroprotetor sobre as doenças neurodegenerativas (Sestili, 2006; Tarnopolsky, 2007; Bolaños, 2009). O piruvato, o substrato energético, também é considerado um antioxidante potente e agente neuroprotetor (Ryou, 2012; Ullah, 2011; Giandomenico, 1997). O piruvato protege da lesão neuronal causada pelo peróxido de hidrogênio (Jagtap, 2003), proporcionando resistência simultânea ao estresse oxidativo e ao insulto mitocondrial (Mazzio, 2003). Além disso, o piruvato desempenha um papel chave no metabolismo intermediário, como um produto intermediário da glicólise e o substrato de partida para o ciclo de ácido tricarboxílico (TCA). Além disso, a eliminação de

H₂O₂ pelo piruvato gerado endogenamente é, provavelmente, uma chave de defesa celular contra o estresse oxidativo, especialmente em células de proliferação (Brand, 1997). O piruvato protege as células do estresse oxidativo e do insulto mitocondrial devido à sua capacidade para servir como um substrato energético neuronal eficaz da glicólise e por atuar como um antioxidante poderoso, atuando como “scavenger” (sequestrador) de espécies reativas (Andrae, 1985; Kitamura, 1999; Palomba, 1999; Mazzi, 2003). Os nossos resultados mostraram que a atividade de PK não foi alterada pela sarcosina e/ou piruvato mais creatina no córtex cerebral.

A atividade da bomba Na⁺, K⁺-ATPase não foi alterada no córtex cerebral de ratos submetidos a tratamento sarcosina, bem como as atividades do complexo II e II-III. Por outro lado, temos demonstrado que a sarcosina foi capaz de aumentar a atividade da succinato desidrogenase e inibir a atividade de complexo IV, sugerindo que a cadeia respiratória mitocondrial foi alterada no córtex cerebral de ratos. A redução do fluxo da cadeia de transporte de elétrons (fosforilação oxidativa prejudicada) implica menor produção de ATP para sustentar as necessidades de energia das células.

Um mecanismo possível poderá ser a interação direta entre a sarcosina e as enzimas. Por outro lado, outro mecanismo para os efeitos de sarcosina sobre as enzimas estudadas pode ser a indução de estresse oxidativo, principalmente na mitocôndria, local principal de produção de espécies reativas (Sas, 2007). Na verdade, os grupos sulfidrilas da GAPDH, AK, BB-CK, e Mi-CK são altamente susceptíveis a espécies de oxigênio e de nitrogênio (Yufu, 1993), induzidas por agentes oxidantes. Além disso, a metilação das enzimas poderia ocorrer, uma vez que a desmetilação oxidativa de sarcosina a glicina ocorre principalmente no fígado, resultando na formação de um carbono ativo, um fragmento de 5,10- tetra-hidrofolato metileno. A sarcosina poderia também induzir a formação de aductos com os produtos de

lipoperoxidação, principalmente, 4-hidroxi-2- nonenal (Reznick, 1994).

Em resumo, nesse estudo mostramos que sarcosina induz estresse oxidativo e altera os parâmetros de rede de fosforiltransferência em córtex cerebral de ratos. Além disso, a co-administração de creatina e piruvato foi capaz de prevenir alguns dos efeitos nocivos da sarcosina em alguns parâmetros de estresse oxidativo e no metabolismo energético. Outros estudos *in vivo* devem ser realizados para confirmar esses resultados. Se descobertas semelhantes forem obtidas em humanos, é possível propor que a administração de anti-oxidantes, tais como creatina mais piruvato, deve ser considerada como uma potencial terapia para pacientes afetados por sarcosinemia.

III.2. CONCLUSÕES

Objetivo 1 - Elaborar um modelo agudo de sarcosinemia, através de parâmetros farmacocinéticos, injetando sarcosina três vezes ao dia com um intervalo de três horas em ratos Wistar de 7, 14 e 21 dias de idade.

- 1) As concentrações plasmáticas e cerebrais de sarcosina atingiram níveis de três a quatro vezes mais elevados do que os níveis normais em ratos Wistar;
- 2) Os níveis de sarcosina plasmáticos e cerebrais diminuíram de uma maneira dependente do tempo, atingindo níveis normais após 6 horas;

Objetivo 2 - Determinar o efeito da administração subcutânea de 0,5 $\mu\text{mol/g}$ de sarcosina sobre parâmetros do metabolismo energético e de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos Wistar de 21 dias de idade.

- 1) A administração aguda de sarcosina induziu o estresse oxidativo e diminuiu as atividades da AK, GAPDH, complexo IV e CK citosólica e mitocondrial;
- 2) O conteúdo total de sulfidrilas foi significativamente reduzido, enquanto que a oxidação do DCFH, níveis de TBARS e as atividades da SOD e GPx foram significativamente aumentadas pela administração aguda de sarcosina, entretanto, a atividade da SDH foi aumentada em córtex cerebral de ratos;

Objetivo 3 - 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 de ratos Wistar de 21 dias de idade.

1) A co-administração de creatina mais piruvato foi eficaz na prevenção de alterações provocadas pela administração de sarcosina sobre o estresse oxidativo e as enzimas de rede fosforiltransferência. Esses resultados indicam que a administração aguda de sarcosina pode estimular o estresse oxidativo e alterar o metabolismo energético em córtex cerebral de ratos;

Nossos resultados demonstraram que a creatina mais piruvato foi capaz de evitar perturbações bioenergéticas como as inibições das enzimas da rede fosforiltransferência e de estresse oxidativo pela sarcosina, sugerindo que a creatina mais piruvato podem ter um papel protetor no cérebro. Esses dados são muito encorajadores, uma vez que a suplementação de creatina e piruvato poderá vir a se constituir em uma boa alternativa terapêutica para pacientes com sarcosinemia. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar outros processos e mecanismos envolvidos nas disfunções neurológicas apresentadas por esses pacientes.

III. 3. PERSPECTIVAS

Esse trabalho abre oportunidades para novos estudos, tais como:

1 - Investigar o efeito da administração crônica de sarcosina sobre parâmetros do metabolismo energético e de parâmetros de estresse oxidativo no córtex cerebral de ratos Wistar de 21 dias de idade;

2 – Investigar os efeitos da infusão de sarcosina na região CA1 do hipocampo dorsal sobre o comportamento dos ratos;

3 - Analisar, *in vitro*, os efeitos da sarcosina sobre parâmetros enzimáticos do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos Wistar de 21 dias de idade;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Anderson, D, 1996. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *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 Lett* 28(2–3), 93–98.

Babcock GT, Wikstrom M, 1992. Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature.* 356, 301-9.

Baird MF, Graham SM, Baker JS, Bickerstaff GF, 2012. Creatine-Kinase- and Exercise-Related Muscle Damage Implications for Muscle Performance and Recovery. *Journal of Nutrition and Metabolism.* 2012, 960363.

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.

Benson PF, Fenson RH, 1985. *Genetic biochemical disorders.* Oxford, Oxford univ. Press, p. 252-5.

Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M, 1999. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life sciences* 65, 1865-1874.

Bickel H, 1987. Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. *Enzyme,* 38, 14-26.

Blanco G, 2005. Na, K-ATPase Subunit Heterogeneity As A Mechanism For Tissue-Specific Ion Regulation. *Seminars In Nephrology.* 25, 292-303.

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.

Boveris A, 1998. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina* 58, 350-356.

Brand K, 1997. Aerobic glycolysis by proliferating cells: protection against oxidative stress at the expense of energy yield. *J Bioenerg Biomembr* 29, 355– 364.

Cavallini L, Valente M, Rigobello MP, 1990. The protective action of pyruvate on recovery of ischemic rat heart: comparison with other oxidizable substrates. *J Mol Cell Cardiol* 22(2): 143–154.

Carter GT, Wineinger MA, Walsh SA, Horasek SJ, Abresch RT, Fowler WM, 1995. Effect of voluntary wheel-running exercise on muscles of the mdx mouse. *Neuromuscul Disord,* 5, 323-332.

Chakraborty H, Sen P, Sur A, Chatterjee U, Chakrabarti S, 2003. Age-Related Oxidative

- Inactivation of Na^+ , K^+ -ATPase in Rat Brain Crude Synaptosomes. *Exp Gerontol.* 38, 705-710.
- Chen X, Guo C and Kong J, 2012. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res* 15, 376-385.
- Clark JB, Bates TE, Cullingford T, Land JM, 1993. Development of enzymes of energy metabolism in the neonatal mammalian brain. *Dev Neurosci* 15, 174-180.
- 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.
- Consler TG, Jennewein MJ, Cai GZ, Lee JC, 1992. Energetics of allosteric regulation in muscle pyruvate kinase. *Biochemistry*, 31, 7870-7878.
- Crestanello JA, Kamelgard J, Whitman GJ, 1995. The cumulative nature of pyruvate's dual mechanism for myocardial protection. *J Surg Res* 59(1), 198-204.
- 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 et al, 2014. 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, 1184-94.
- Dencher NA, Frenzel M, Reifschneider NH, Sugawa M, Krause F, 2007. Proteome alterations in rat mitochondria caused by aging. *Ann N Y Acad Sci.* 1100, 291-298.
- Desagher S, Glowinski J, Premont J, 1997. Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *J Neurosci: Off J Soc Neurosci* 17(23), 9060-9067.
- Diplock AT, 1994. Antioxidants and free radical scavengers. In: Rice-Evans CA, Burdon RH, eds. *Free radical damage and its control.* Amsterdam: Elsevier, p. 113-130.
- Dzeja PP, Terzic A, 1998. Phosphotransfer reactions in the regulation of ATP-sensitive K^+ -channels. *FASEB J* 12, 523-529.
- 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.
- Dzeja PP, Redfield MM, Burnett JC, Terzic A, 2000. Failing energetics in failing hearts. *Curr Cardiol Rep* 2, 212-217.
- Dzeja PP, Bortolon R, Perez-Terzic C, Holmuhamedov EL, Terzic A, 2002. Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 10156-10161.
- Dzeja PP, Terzic A, 2003. Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J Exp Biol* 206, 2039-2047.
- 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.
- Enesco M, Leblond CP, 1962. Increase in cell number as a factor in the growth of the organs and tissues of the young male rat. *J Embryol Exp Morphol* 10, 530-562.
- Erecinska M, Cherian S, Silver IA, 2004. Energy metabolism in mammalian brain during development. *Prog Neurobiol.* 73, 397-445.

Esterbauer H, Cheeseman KH, 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186, 407–421.

Fambrough, DM, Lemas MV, Hamrick M, Emerick M, Renaud KJ, Inman EM, Hwang B, Takeyasu K, 1994. Analysis of subunit assembly of the Na-K-ATPase. *Am J Physiol.* 266, C579-C589.

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.

Fouchard AA, Corcia P, Allais C, Blasco H, De Toffol B, Maillot F, 2016. Inborn Errors of Metabolism in Elderly Adults. *J Am Geriatr Soc.* doi: 10.1111/jgs.14333. [Epub ahead of print].

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.

Gerritsen T, Waisman HA, 1966. Hypersarcosinemia: an inborn error of metabolism. *N Engl J Med* 275, 66–69.

Giandomenico AR, Cerniglia GE, Biaglow JE, Stevens CW, Koch CJ, 1997. The importance of sodium pyruvate in assessing damage produced by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 23(3), 426–434.

Gross M, Wyss M, Furter-Graves EM, Wallimann T, Furter R, 1996. Reconstitution of active octameric mitochondrial creatine kinase from two genetically engineered fragments. *Protein Sci,* 2, 320-330.

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 JMC, 1999. Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death. In: *Free Radicals in Biology and Medicine,* 3 th ed. Oxford: Oxford University Press, p. 246-349.

Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) Measurement of reactive species. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, 4 eds. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford: Oxford University Press, p. 268–340.

Harding CO, Williams P, Pflanzner DM, Colwell RE, Lyne PW, Wolff JÁ, 1992. SAR: a genetic mouse model for human sarcosinemia generated by ethylnitrosourea mutagenesis. *Proc Nat Acad Sci.* 89, 2644–2648.

Haerter PJ, Taniguchi T, 1999. Hydrogen peroxide induced apoptosis mediated by p53 protein in glial cells. *Glia* 25,154–164.

Herdon HJ, Godfrey FM, Brown AM, Coulton S, Evans JR, Cairns WJ, 2001. Pharmacological assessment of the role of the glycine transporter GlyT-1 in mediating high-affinity glycine uptake by rat cerebral cortex and cerebellum synaptosomes. *Neuropharmacology* 41, 88–96.

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.

Heady JE, Kerr SJ, 1973. Purification and characterization of glycine N-methyltransferase. *J Biol Chem* 248, 69.

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.

Himwich WA, 1973. Problems in interpreting neurochemical changes occurring in developing and aging animals. *Prog Brain Res*. 40, 13-23.

Hotzman D, Tsuji M, Wallimann T, Hemmer W, 1993. Functional maturation of creatine kinase in rat brain. *Dev Neurosci* 15, 261-270.

Jagtap JC, Chandele A, Chopde BA, Shastry P, 2003. Sodium pyruvate protects against H₂O₂ mediated apoptosis in human neuroblastoma cell line-SK-N-MC. *J Chem Neuroanat* 26, 109– 118.

Jorgensen PL, Hakansson KO, Karlsh SJ, 2003. Structure And Mechanism Of Na, K-ATPase: Functional Sites And Their Interactions. *Annu Rev Physiol*. 65, 817-849.

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.

Kaplan JH, 2002. Biochemistry Of Na, K-ATPase. *Annu Rev Biochem*. 71, 511-535.

Kerr SJ, 1972. Competing methyltransferase systems. *J Biol Chem* 247, 4248-52.

Knight RJ, Kofoed KF, Schelbert HR, Buxton DB, 1996. Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in post-ischaemic myocardium. *Cardiovasc Res* 32, 1016-23.

Kono Y, Fridovich I, 1982. Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 257, 5751–5754.

Kracht LW, FrieseM, Herholz K, Schroeder R, Bauer B, Jacobs A, Heiss WD, 2003. Methyl-[11C]- l-methionine uptake as measured by positron emission tomography correlates to microvessel density in patients with glioma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30, 868–873.

Kitamura Y, Ota T, Matsuoka Y, Tooyama I, Kimura H, Shimohama S, Normura Y, Gebicke-Haerter PJ, Nomura Y, Taniguchi T, 1998. Kainic acid-induced neuronal loss and glial changes in the hippocampal CA3 of p53-deficient mouse. *Neurosci Lett*. 255(1), 57-60.

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

Lee JY, Kim YH, Koh JY, 2001. Protection by pyruvate against transient forebrain ischemia in rats. *J Neurosci: Off J Soc Neurosci* 21(20), 1–6.

Levy HL, Coulombe JT, Benjamin R, 1984. Massachusetts metabolic disorders screening programme. III. Sarcosinemia. *Pediatrics* 74, 509-513.

Liu Q-R, López-Corcuera B, Mandiyan S, Nelson H, Nelson N, 1993. Cloning and expression of a spinal cord- and brain-specific glycine transporter with novel structural features. *J Biol Chem* 268, 22802-8.

Lopez-Corcuera B, Martinez-Maza R, Nunez E, Roux M, Supplisson S, Aragon C, 1998. Differential properties of two stably expressed brain-specific glycine transporters. *J Neurochem*

71, 2211–2219.

Lopina OD, 2000. Na⁺, K⁺-ATPase: Structure, Mechanism, And Regulation. *Membr Cell Biol.* 13, 721-744.

Mallorga PJ, Williams JB, Jacobson M, Marques R, Chaudhary A, Conn PJ, Pettibone DJ, Sur C, 2003. Pharmacology and expression analysis of glycine transporter GlyT1 with [3 H]-(N-[3-(4'-fluorophenyl)-3-(4'phenylphenoxy)propyl])sarcosine. *Neuropharmacology* 45, 585–593.

Maus M, Marin P, Israel M, Glowinski J, Premont J, 1999. Pyruvate and lactate protect striatal neurons against N-methyl-D-aspartate- induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci* 11(9), 3215–3224.

Marks AD, Smith C, Lieberman M. *Bioquímica médica de Marks*, Porto Alegre, Artmed, 2^oed, 2007.

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.

Marzo A, 1997. Clinical pharmacokinetic registration file for NDA and ANDA procedures. *Pharmacol Res* 36, 425–450.

Marshall WJ, Bangert SK, 1995. *Clinical Chemistry*. Fifth edition.

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 8OH²dG. *Neurology* 66, 250–252.

McLeish MJ, Kenyon GL, 2005. Relating Structure to Mechanism in Creatine Kinase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 40, 1-20.

Mitchell AD, Benevenga NJ, The role of transamination in methionine oxidation in the rat. *J Nutr* 108:67-78.

Nelson DL, Cox MM, 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5a ed. WH. Freeman and Company, New York.

Neumann D, Schlattner U, 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. Med Invest* 52, 127-136.

Oberfelder RW, Barisas BG, Lee JC, 1984. Thermodynamic linkages in rabbit muscle pyruvate kinase: kinetic, equilibrium, and structural studies. *Biochemistry* 23, 3813-3821.

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(2), 500–514.

O'Kane RL, Hawkins RA, 2003. Na⁺-dependent transport of large neutral amino acids occurs at the abluminal membrane of the blood-brain barrier. *AmJ Physiol Endocrinol Metab* 285, 1167–1173.

Oskam R, Van Els CA, Rijksen G, Staal GE, 1985. Pyruvate kinase isozymes and dedifferentiation of (neuro-) ectodermal tumors. *Tumour Biol.* 6(1), 75-87.

Palomba L, Sestili P, Columbaro M, Falcieri E, Cantoni O, 1999. Apoptosis and necrosis

following exposure of U937 cells to increasing concentrations of hydrogen peroxide: the effect of the poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor 3-aminobenzamide. *Biochem Pharmacol* 58, 1743–1750.

Penz J, Gemelli T, Carvalho CAS, Guerra RB, Olibone L, Salvador M, Dani D, Araújo AS, Funchal C, 2009. Effect of 3-butyl-1-phenyl-2-(phenyltelluro)oct-en-1-one on oxidative stress in cerebral cortex of rats. *Food Chem Toxicol* 47, 745–751.

Perryman MB, Kerner S, Bohlmeier S, Bohlmeier TJ, Roberts R, 1986. Isolation and sequence analysis of a full-length cDNA for human M creatine kinase. *R Biochem Biophys Res Commun* 140, 981-989.

Proteome Alterations In Rat Mitochondria Caused By Aging, 2007. *Ann N Y Acad Sci* 1100, 291-298.

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

Pucar D, Dzeja PP, Bast P, Gumina RJ, Drahl C, Lim L, Juranic N, Macura S, Terzic A, 2004. Mapping hypoxia-induced bioenergetic rearrangements and metabolic signaling by 18O-assisted 31P NMR and 1H NMR spectroscopy. *Mol Cell Biochem* 256–257, 281–289.

Rauchova H, Drahotka Z, Koudelova J, 1999. The Role Of Membrane Fluidity Changes And Thiobarbituric Acid-Reactive Substances Production In The Inhibition Of Cerebral Cortex Na⁺/K⁺-ATPase Activity. *Physiol Res* 48, 73-8.

Reznick AZ, Packer L, 1994. Oxidative damage of proteins: spectrophotometer for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233, 357–363.

Rojas DB, de Andrade RB, Gemelli T et al, 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, 595–603.

Rojo M, Hovius R, Demel R, Wallimann T, Eppenberger HM, Nicolay K, 1991. Interaction of mitochondrial creatine kinase with model membranes. A monolayer study 281, 123-129.

Ross EM, Gilman AG, 1990. Pharmacodynamics: mechanism of drug action and the relationship between drug concentration and effect. In: Gilman AG, Goodman LS, Rall TW, Murad F, 8 eds. *The pharmacological basis of therapeutics*, 8rd edn. Macmillan Publishing Company, New York chapter 2

Ryou MG, Liu R, Ren M, Sun J, Mallet RT, Yang SH, 2012. Pyruvate protects the brain against ischemia–reperfusion injury by activating the erythropoietin signaling pathway. *Stroke* 43, 1101–1107.

Salahudeen AK, Clark EC, Nath KA, 1991. Hydrogen peroxide-induced renal injury. A protective role for pyruvate in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 88(6), 1886–1893.

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

Saks VA, Ventura-Clapier R, Aliev MK, 1996. Metabolic control and metabolic capacity: two aspects of creatine kinase functioning in the cells. *Biochim Biophys Acta* 1274, 81-88.

Sas K, Robotka H, Toldi J, Vécsei L, 2007. Mitochondria, metabolic disturbances,

oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J Neurol Sci* 257, 221-239.

Schardein JL, 1998. Animal/human concordance in: Slikker WJr, Chang LW, ed. *Handbook of developmental neurotoxicology*. San Diego: Academic Press, pp. 687–708.

Schulze A, 2003. Creatine deficiency syndromes. *Mol Cell Biochem* 244,143– 150.

Scott CR, Clark SH, Teng CC, Teng, Swedberg KR, 1970. Clinical and cellular studies of sarcosinemia. *J Pediat.* 77, 805-11.

Scott CR, 2001. Sarcosinemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: The McGraw-Hill Companies, pp. 2057–2063.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, 2001. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8.ed. New York: McGraw-Hill Inc, p. 3-45, 2001.

Sestili P, Martinelli C, Bravi G, Piccoli G, Curci R, Battistelli M, Falcieri E, Agostini D, Giocchini 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.

Sestili P, Martinelli C, Bravi G et al, 2006. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 40, 837– 849.

Sheline CT, Behrens MM, Choi DW, 2000. Zinc-induced cortical neuronal death: contribution of energy failure attributable to loss of NAD(+) and inhibition of glycolysis. *J Neurosci: Off J Soc Neurosci* 20(9), 3139–3146.

Skvorak KJ, 2009. Animal models of maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis* 32, 229–246.

Smith KE, Borden LA, Hartig PR, Branchek T, Weinshank RL, 1992. Cloning and expression of a glycine transporter reveal colocalization with NMDA receptors. *Neuron* 8, 927–935.

Shami NJIE, Moreira EAM, 2004. Licopeno como agenteantioxidante. *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.

Sukuki YJ, Edmondson JD, Ford GD, 1992. Inactivation of rabbit muscle creatine kinase by hydrogen peroxide. *Free Radicals Res Commun*, 16, 131-136.

Taguchi K, Kumanogoh H, Nakamura S, Maekawa S, 2006. Ouabain-Induced Isoform-Specific Localization Change Of The Na⁺, K⁺-ATPase Alpha Subunit In The Synaptic Plasma Membrane Of Rat Brain. *Neurosci Lett.* 413, 42-45.

Tappel AL, 1973. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed Proc* 32, 1870–

1874.

Tarnopolsky MA, 2007. Clinical use of creatine in neuromuscular and neurometabolic disorders. *Subcell Biochem* 46, 183–204.

Tsacopoulos M, Magistretti PJ, 1996. Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci: Off J Soc Neurosci* 16(3), 877–885.

Ueland PM, Middtun O, Windelberg A, Svardal A, Skalevik R, Hustad S, 2007. Quantitative profiling of folate and one-carbon metabolism in large-scale epidemiological studies by mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 45,1737–1745.

Ullah N, Naseer MI, Ullah I, Lee HY, Koh PO, Kim MO, 2011. Protective effect of pyruvate against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *Neuropharmacology* 61,1248–1255.

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 MTD, Mazur M, Telser J, 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 44-84.

Villarreal-Levy G, MA TS, Kerner SA, Roberts R, Perryman MB, 1987. Human creatine kinase: isolation and sequence analysis of cDNA clones for the B subunit, development of subunit specific probes and determination of gene copy number. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144, 1116-1127.

Wagner C, Decha-Umphai W, Corbin J, 1989. Phosphorylation modulates the activity of glycine N-methyltransferase, a folate binding protein. *J Biol Chem* 264, 9638-42.

Wang XQ, Xiao AY, Sheline C, Hyrc K, Yang A, Goldberg MP, Choi DW, Yu SP, 2003. Apoptotic Insults Impair Na⁺, K⁺-ATPase Activity As A Mechanism Of Neuronal Death Mediated By Concurrent ATP Deficiency And Oxidant Stress. *J Cell Sci.* 116, 2099-2110.

Wallace DC, 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science.* 283, 1482-8.

Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, 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.* 28, 121–140.

Wallimann T, 1994. Dissecting the role of creatine kinase. *Current Biology* 1, 42-48.

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.

Winick M, Noble A, 1965. Quantitative changes in DNA, RNA and protein during prenatal and postnatal growth in rat. *Dev Biol* 12, 451–466.

Whittingham TS, Lipton, P, 1981. Cerebral synaptic transmission during anoxia is protected by creatine. *J Neurochem.* 37, 1618-1621.

Wyss M, Smeitink J, Wevers R, Wallimann T, 1992. Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1102, 119-166.

Wyss M, Schulze A, 2002. Health Implications Of Creatine: Can Oral Creatine

Supplementation Protect Against Neurological And Atherosclerotic Disease? Neuroscience. 112, 243-260.

Yu T-W, Anderson D, 1997. Reactive oxygen species induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. Mutation Research, Amsterdam 379(2), 201-210.

Yufu K, Itoh T, Edamatsu R, Mori A, Hirakawa M, 1993. Effect of hyperbaric oxygenation on the Na⁺, K⁺-ATPase and membrane fluidity of cerebrocortical membranes after experimental subarachnoid hemorrhage. Neurochemical Research 9, 1033– 1039.

Zhang HX, Hyrc K, Thio LL, 2009. The glycine transport inhibitor sarcosine is an NMDA receptor co-agonist that differs from glycine. J Physiol 587, 3207–3220.