

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CREATINA E PIRUVATO SOBRE
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E ESTRESSE OXIDATIVO
INDUZIDAS PELA ADMINISTRAÇÃO DE TRIPTOFANO EM RATOS**

VIVIAN STRASSBURGER ANDRADE

Orientador: Prof. Dr. Clovis Milton Duval Wannmacher

Porto Alegre, 2011

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CREATINA E PIRUVATO SOBRE
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E ESTRESSE OXIDATIVO
INDUZIDAS PELA ADMINISTRAÇÃO DE TRIPTOFANO EM RATOS**

VIVIAN STRASSBURGER ANDRADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Clovis Milton Duval

Wannmacher

Porto Alegre, 2011

CIP - Catalogação na Publicação

Andrade, Vivian Strassburger

Efeitos da administração de creatina e piruvato sobre alterações comportamentais e estresse oxidativo induzidas pela administração de triptofano em ratos / Vivian Strassburger Andrade. -- 2011.

60 f.

Orientador: Clovis Milton Duval Wannmacher.

Dissertação (Mestrado) -- 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, 2011.

1. alterações comportamentais. 2. estresse oxidativo. 3. creatina. 4. piruvato. 5. triptofano. I. Wannmacher, Clovis Milton Duval, orient. II. Título.

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

“Daria tudo que sei pela metade do que ignoro”

Descartes

III

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu querido professor orientador, Dr. Clóvis Wannmacher, pelos ensinamentos, paciência e carinho ao longo de todo caminho.

Agradeço imensamente à meus pais, meus grandes incentivadores e educadores de toda vida.

Ao meu namorado, Marcelo, que por muitas vezes me deu força e encorajamento e à sua família, um pouca minha, agora também.

Aos familiares amados, peças fundamentais na construção de minha educação.

Aos amigos queridos, de longa e pouca data, sem dúvida nenhuma, a família que eu escolhi.

Aos colegas do laboratório 34, colaboradores dedicados de trabalho e amigos queridos.

E a Deus, nosso criador, por me presentear todos os dias com a dádiva de estar viva.

SUMÁRIO

PARTE I

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
I.1.INTRODUÇÃO.....	12
I. 1.1. Erros Inatos do Metabolismo de Aminoácidos.....	12
I. 1.2. Metabolismo do Triptofano.....	12
I. 1.2.1. Alterações no Metabolismo de Triptofano.....	15
I. 1.2.1.1.Hipertriptofanemia.....	15
I. 1.3. Doença de Huntington.....	17
I. 1.4.Doença de Alzheimer.....	18
I. 1.5.Doença de Parkinson.....	19
I. 1.6. Estresse Oxidativo.....	20
I. 1.6.1. Fontes Oxidativas.....	21
I. 1.7. Substâncias Oxidantes.....	21
I. 1.7.1.Creatina.....	21
I. 1.7.2. Piruvato.....	23
I. 1.8. Campo Aberto e any-maze.....	23
2. OBJETIVOS.....	25

PARTE II

ARTIGO - Creatine and pyruvate prevent behavioral and oxidative stress alterations caused by hypertryptophanemia in rats.....	26
---	----

PARTE III

1. DISCUSSÃO.....	51
2. CONCLUSÃO.....	53
3. PERSPECTIVAS.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS.....	55

RESUMO

Nos seres humanos o triptofano é metabolizado por várias vias, produzindo compostos biologicamente importantes chamados quinureninas, serotonina, ácidos indólicos, compostos ácidos nicotínicos (niacina) e ácido quinolínico. Em condições normais, pouquíssimo triptofano aparece convertido em ácido nicotínico. Sabe-se que o acúmulo de triptofano e seus metabólitos está relacionado ao dano cerebral encontrado tanto na hipertriptofanemia quanto em doenças neurodegenerativas. Nesse trabalho, nós investigamos o efeito da administração de triptofano sobre vários parâmetros comportamentais no teste de campo aberto e de estresse oxidativo e o efeito de creatina e piruvato, sobre os efeitos do triptofano. Quarenta ratos Wistar, machos, de 60 dias, foram aleatoriamente divididos em 4 grupos: salina; triptofano; piruvato + creatina; triptofano + piruvato + creatina. Os animais receberam 3 injeções subcutâneas de triptofano ($2 \mu\text{mol/g}$ peso corporal cada um em intervalos de 3 horas) e/ou piruvato ($200 \mu\text{g/g}$ peso corporal 1 hora antes do triptofano) e/ou creatina ($400 \mu\text{g/g}$ peso corporal 2 vezes por dia durante 5 dias antes do treino); os controles receberam solução salina (NaCl 0.85g%) nos mesmos volumes ($30 \mu\text{L/g}$ peso corporal) das outras substâncias. Uma vez que, a redução progressiva da atividade exploratória no campo aberto pode ser interpretada como um indicador de que os animais reconheceram e lembraram do ambiente nossos resultados mostram que o triptofano aumentou a atividade dos animais, sugerindo a redução da habilidade de habituação ao ambiente e um déficit de aprendizagem/memória causada por este aminoácido. O triptofano também induziu aumento de TBA-RS e a redução de sulfidrilas totais no hipocampo, indicando indução de estresse oxidativo. Os efeitos do triptofano no campo aberto e no estresse oxidativo, foram totalmente prevenidos pelo pré-tratamento com creatina mais piruvato, dois potentes antioxidantes, reforçando a hipótese de estresse oxidativo.

Nossos achados, estão de acordo ao que pode ser observado em pacientes afetados pela hipertriptofanemia e doenças neurodegenerativas, ou em outras doenças em que ocorra o acúmulo de triptofano. É possível que o estresse oxidativo possa estar envolvido nos mecanismos que levar à lesão cerebral, sugerindo que a suplementação de creatina e piruvato poderia beneficiar os pacientes afetados por esses transtornos.

Estudos adicionais serão necessários para compreensão de como o triptofano é causador de dano, se é pelo seu acúmulo ou pelo acúmulo de seus metabólitos. Além disso, também será necessária uma maior investigação para avaliar se a suplementação com creatina e piruvato é possível de ser recomendada à pacientes com hipertriptofanemia ou doenças degenerativas.

ABSTRACT

In human, tryptophan is metabolised by multiple pathways, producing several compounds, namely kynurenines, serotonin, indolic acids, nicotinic acid (niacin) compounds and quinolinic acid. Under normal conditions, very little tryptophan appears converted to nicotinic acid. It is known that the accumulation of tryptophan and its metabolites is related to brain damage associated with both hypertryptophanemia and neurodegenerative diseases. In this work, we investigated the effect of tryptophan administration on various parameters of behavior in the open field task and oxidative stress, and the effects of creatine and pyruvate, on the effect of tryptophan. Forty, sixty-day-old male Wistar rats, were randomly divided into 4 groups: saline; tryptophan; pyruvate + creatine; pyruvate + creatine. Animals received 3 subcutaneous injections of tryptophan ($2 \mu\text{mol/g}$ body weight each one at 3 h of intervals) and/ or pyruvate ($200 \mu\text{g/g}$ body weight 1 h before tryptophan) and/or $400 \mu\text{g/g}$ body weight twice a day for 5 days before tryptophan twice a day for 5 days before training; controls received saline solution ($\text{NaCl } 0.85 \text{ g\%}$) at the same volumes ($30 \mu\text{L/g}$ body weight) than the other substances. Since the progressive reduction of exploratory activity in open field can be interpreted as an indicator that animals recognize and remember the environment our results showed that tryptophan increased the activity of the animals, suggesting a reduction in the ability of habituation to the environment and a deficit in learning/memory caused by this amino acid. Tryptophan induced increase of TBA-RS and total sulfhydryls in the hippocampus, indicating induction of oxidative stress. The effects of tryptophan in the open field, and in oxidative stress were fully prevented by the combination of creatine plus pyruvate, two powerful antioxidants, reinforcing the idea of oxidative stress. In case these findings also occur in humans affected by hypertryptophanemia or other neurodegenerative disease in which tryptophan

accumulates, it is feasible that oxidative stress may be involved in the mechanisms leading to the brain injury, suggesting that creatine and pyruvate supplementation could benefit patients affected by these disorders.

Additional studies are needed to understand how tryptophan is causing damage if it is by its accumulation or accumulation of metabolites. In addition, further research is needed to assess whether supplementation with creatine and pyruvate can be recommended to patients with degenerative diseases or hypertryptophanemia.

LISTA DE ABREVIATURAS

Trp: triptofano

EIM: erros inatos do metabolismo

3-HK: 3-hidroxiquinurenina

CK: creatina cinase

HD: doença de huntington

AD: doença de alzheimer

PD: doença de parkinson

ROS: espécies reativas de oxigênio

Cr: creatina

CrP: creatina fosfato

RL: radicais livres

Pir: piruvato

NMDA: receptor n-metil-d-aspartato

1.INTRODUÇÃO

1.1. Erros Inatos do Metabolismo de Aminoácidos

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

O EIM foi sugerido em 1909 por Archibald Garrod, a partir de estudos com pacientes que apresentavam alcaptonúria, albinismo, cistinúria e pentosúria. Ele verificou que as doenças apresentavam uma distribuição familiar e ocorriam, com maior frequência, nos filhos de casamentos consanguíneos.

Desde o estudo inicial de Garrod em 1909, sobre os 4 erros inatos, o conhecimento destas doenças metabólicas tem crescido geometricamente. Foram descritos até o momento mais de 500 EIM (Scriver et al, 2001), a maioria envolvendo 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 cause morte neonatal (Benson e Fenson, 1985). Os EIM manifestam-se geralmente na infância, apresentando sinais e sintomas semelhantes aos encontrados em muitas doenças infantis (Holtzman, 1978).

1.2. Metabolismo do Triptofano

O triptofano (Trp), é um aminoácido essencial, aromático oxidado para produzir alanina, formato e acetil-CoA, sendo considerado portanto, glicogênico e cetogênico. Uma dieta humana normal fornece de 600 a 900 mg de Trp diariamente. Além de ser parcialmente incorporado em proteínas (30% do Trp da dieta). Nos seres humanos o Trp é metabolizado por várias vias, produzindo compostos biologicamente importantes chamados quinureninas, serotonina, ácidos indólicos, compostos ácidos nicotínicos (niacina) e ácido quinolínico. Sob condições normais, pouquíssimo Trp aparece convertido em ácido nicotínico (Allegri et al., 2003; Musajo e Benassi, 1964; Price et al., 1965; Peters, 1991). As rotas metabólicas deste aminoácido estão resumidas na figura 1.

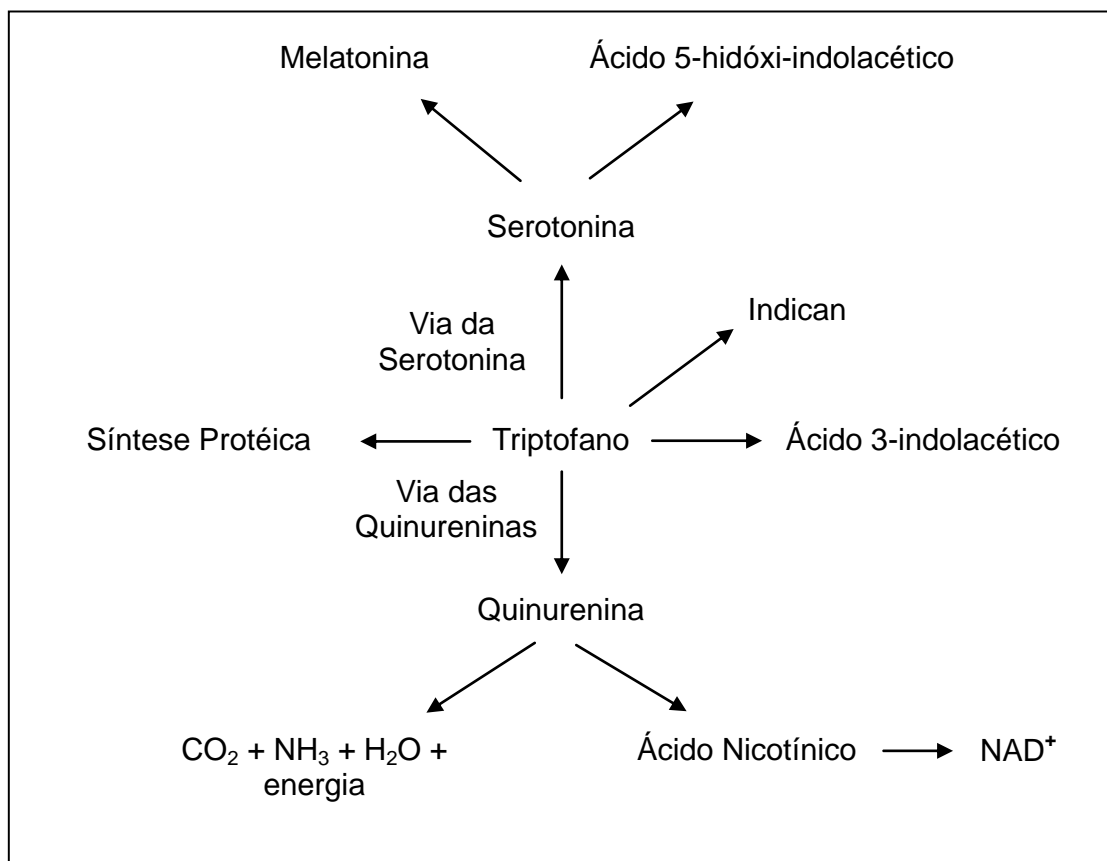


Figura 1. Rotas metabólicas do triptofano.

A via das quinureninas é a maior rota catabólica do Trp, levando à biossíntese de

3-hidroxiquinurenina (3HK) e metabólitos intermediários (Okuda, 1996; Stone, 2001). A 3HK parece ser limpador (“scavenger”) de radicais peróxil, o que leva a crer que ela atue como antioxidante nas doenças inflamatórias (Christen et al., 1990). Entretanto, a 3-HK tem demonstrado possuir propriedades neurotóxicas, devidas parcialmente à produção de peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil durante sua auto-oxidação (Okuda et al., 1996) e, juntamente como o ácido quinolínico, parece estar envolvida na fisiopatologia de muitas doenças cerebrais. Além disso, a 3-HK tem a capacidade de aumentar sinergicamente os efeitos neurotóxicos do ácido quinolínico (Chiarugi et al., 2001b).

Um conteúdo aumentado de 3HK é achado no cérebro de pacientes em condições patológicas, como demências associadas à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Sardar e Reynolds, 1995) e encefalopatia hepática (Pearson e Reynolds, 1991), sugerindo que a 3HK pode ser neurotóxica. Esse composto, mas não os outros da via das quinureninas, inibe a atividade da creatina quinase (CK) no córtex cerebral de ratos Wistar (Cornelio, 2006).

A localização celular da via da quinurenina é apenas parcialmente conhecida. Esta via é encontrada em células de linhagem monocítica, incluindo macrófagos e microglia (Espey et al., 1997; Heyes et al., 1992a,b; Smith et al., 2001) e parcialmente em astrócitos (Guillemin et al., 2001a). Entretanto, o cérebro e o fígado são capazes de sintetizar NAD^+ (o produto final da via) a partir de Trp, o que significa que estes dois órgãos contêm todas as enzimas da via da quinurenina (Dale et al., 2000).

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

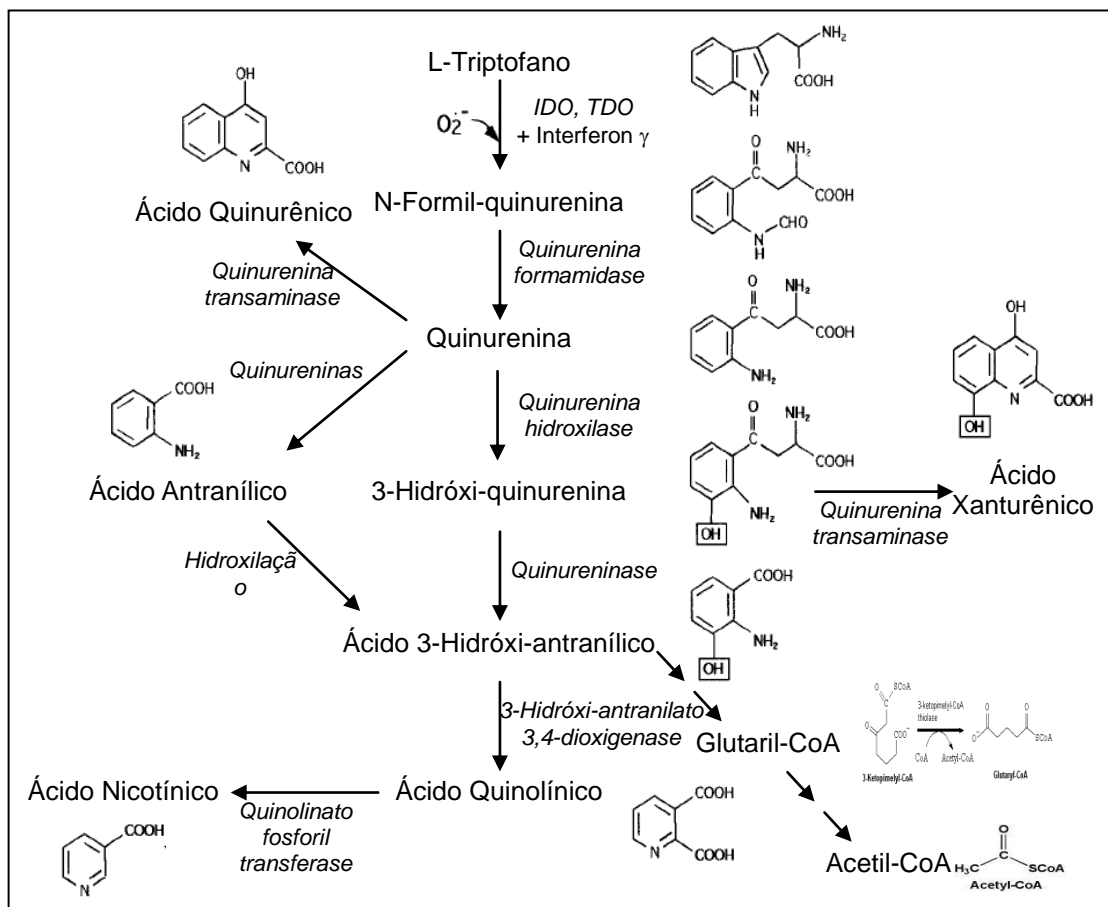


Figura 2. Via da quinurenina.

Além disso, já foi demonstrado que o ácido quinurênico, o ácido antranílico, a 3-HK e o ácido 3-hidroxi-antranílico podem influenciar os parâmetros respiratórios da mitocôndria em coração de ratos, que são importantes para manutenção da função celular (Baran et al., 2003; Baran et al., 2001).

1.2.1. Alterações no Metabolismo do Triptofano

1.2.1.1. Hipertriptofanemia

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

Defeitos congênitos no metabolismo do Trp são raros (Snedden, et al., 1983), embora menos de 12 pacientes com aparente defeito no catabolismo do Trp tenham sido relatados (Levy et al, 2001). Tada e colaboradores em 1963 descreveram uma jovem que apresentava retardo psicomotor, fotossensibilidade anormal e manifestações cutâneas do tipo pelagra. A excreção urinária de Trp estava muito elevada. A administração oral de Trp aumentou significativamente os níveis sangüíneos e urinários deste aminoácido, mas a excreção urinária de quinurenina estava reduzida. Este resultado sugeriu que esta doença fosse devida a um bloqueio em uma das duas etapas da conversão de Trp a quinurenina.

Snedden et al (1983) primeiramente descreveram 2 pacientes irmãos que tinham níveis de Trp aumentado e quinurenina reduzida no plasma e na urina. O irmão de 23 anos de idade apresentava dores generalizadas nas articulações, instabilidade emocional, visão defeituosa, gagueira e hipersexualidade. A avaliação neuropsicológica realizada demonstrou mudanças rápidas no estado de humor, QI de 75 na avaliação verbal e QI de 86 na avaliação em testes de memória, sugerindo problemas de armazenamento e processamento de informações. O comportamento da irmã com 22 anos de idade, assim como o do irmão, foi caracterizado por mudanças abruptas no estado de humor, variando completamente de estado alegre e afetivo a hostil e depressivo, e comportamento hipersexual. Exame psiquiátrico indicou moderado retardo mental. O

Trp encontrava-se bastante elevado na urina e no plasma (10 vezes acima do normal). A ocorrência nos irmãos e a presença anormal de metabólitos do Trp na urina da mãe deles e do meio irmão, sugerem uma condição de um gene autossômico recessivo com menor expressão em alguns heterozigotos.

Os níveis elevados do Trp no plasma e a presença de diferentes manifestações clínicas dos dois irmãos afetados, distingue-os da Doença de Hartnup e de outros distúrbios do metabolismo do Trp congênitos ou adquiridos relatados (Tada, 1963; Wong, 1976; Levy, 1979; Knapp, 1960; Price, 1967; Kromrover, 1964; Drummond, 1964; Silver, 1992). Wong et al. (1976) descreveram uma criança com retardo de desenvolvimento e de crescimento, ataxia, fotossensibilidade com aumento moderado do Trp plasmático, que se acentuava após a ingestão de Trp. Posteriormente, Martin e colaboradores (1995) também descreveram dois irmãos com aumento do Trp plasmático e excreção aumentada de ácidos indólicos, que apresentavam retardo mental moderado e respostas afetivas exageradas, mudanças de humor periódicas e comportamento hipersexual. Novamente, foi sugerido um bloqueio na conversão de Trp a quinurenina, mas não foram realizados ensaios enzimáticos.

1.3. Doença de Huntington

A doença de Huntington (HD) é uma doença neurológica autossômica dominante caracterizada por movimentos involuntários acompanhados de diminuição da capacidade cognitiva e confusão emocional. As alterações patológicas mais impressionantes são a atrofia, perda neuronal e astrogliose no neoestriado (Ferrante et al., 1985). Apesar de múltiplas populações de neurônios serem afetadas na HD, os neurônios com projeções espinhais contendo ácido γ -aminobutírico e substância P e

encefalina são mais vulneráveis. A HD é uma doença neurológica fatal sem tratamento efetivo disponível, afeta 5 pessoas em cada 100000 e os sintomas normalmente aparecem na faixa dos 40 anos (Qin e Gu, 2004).

Muitos trabalhos têm demonstrado o envolvimento da via da quinurenina na patogênese da HD. Há indícios de que a concentração de ácido quinurênico esteja reduzida no córtex cerebral de pacientes com HD, o que poderia levar a uma diminuição na ligação deste metabólito no sítio de ligação da glicina no receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), conseqüentemente aumentando a atividade do receptor (Beal et al., 1992). Outros estudos demonstraram que os níveis de 3-HK estão aumentados no cérebro de pacientes com HD (Reynolds e Pearson, 1989; Pearson e Reynolds, 1992), principalmente na primeira fase da doença (Guidetti et al., 2000).

Os níveis de glutathione estão significativamente diminuídos em muitas regiões do córtex cerebral na HD, o que pode indicar um metabolismo energético anormal nesta doença, já que defeitos no metabolismo energético podem levar à geração de radicais livres (Beal et al., 1992).

1.4. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (AD) é a causa mais comum de demência em pessoas idosas, atingindo 5-10% da população acima dos 65 anos, e mais de 45% da população acima dos 85 anos de idade. Os sintomas iniciais típicos são prejuízos da memória recente e falta de atenção, seguidos de falhas de linguagem, orientação espacial-visual e pensamento abstrato. Inevitavelmente, alterações de personalidade acompanham esses sintomas (Purves et al., 2001).

Há inúmeras evidências de que a via da quinurenina esteja envolvida na

fisiopatologia da AD (Guillemin e Brew, 2002). A primeira é que os níveis de Trp são inversamente proporcionais ao grau do déficit cognitivo, e altas concentrações séricas de quinurenina foram encontradas em pacientes com grande diminuição da capacidade cognitiva, enquanto que os níveis de ácido quinurênico no fluido cérebro-espinhal estavam diminuídos (Widner et al., 1999, 2000a; Baran et al., 1999; Heyes et al, 1992a).

O aumento do catabolismo do Trp na AD pode levar à deficiência deste aminoácido e pode ter um papel importante na patogênese da doença (Maurizi, 1990; Widner et al., 1999, 2000a). Os níveis cerebrais do fator de crescimento neuronal (NGF) e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) são diretamente dependentes da quantidade de Trp da dieta (Lee et al., 1999). Além disso, os distúrbios do sono e do humor observados na AD podem estar relacionados com um aumento do catabolismo do Trp pela via da quinurenina, limitando a disponibilidade de Trp para a síntese de serotonina (Maurizi, 1990; Widner et al., 2000b; Porter et al., 2000).

1.5. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (PD) é uma das doenças neurodegenerativas mais frequentes. Foi descrita pela primeira vez em 1817 por James Parkinson e é caracterizada por tremor em repouso, lentidão dos movimentos (bradicinesia), rigidez das extremidades e do pescoço e expressões faciais mínimas. Em alguns pacientes é acompanhada por demência. O início da doença se dá entre 50 e 70 anos e progride lentamente para a morte após 10 a 20 anos. Estudos pós-morte revelaram que os níveis de glutathiona reduzida (GSH) estão diminuídos na substância nigra de pacientes com PD, o que evidencia a ocorrência de estresse oxidativo (Sian et al., 1999).

Os níveis de 3-HK estão aumentados no putamen e na substância nigra dos cérebros dos pacientes com PD. A relação quinurenina/3-HK também está diminuída, o

que implicaria numa menor quantidade de quinurenina disponível para a síntese de ácido quinurênico além da síntese aumentada da neurotoxina 3-HK (Ogawa et al, 1992).

1.6. Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um dano tecidual resultante de um desequilíbrio entre uma produção excessiva de compostos oxidantes e mecanismos de defesas antioxidantes ineficientes.

A produção de compostos oxidantes é fisiologicamente relevante como uma etapa importante nos processos de inflamação e reparo tecidual. Além disso, eles representam uma parte dos mecanismos de defesa contra a invasão de microrganismos e células malignas, bem como de restabelecimento e remodelagem tecidual. Por outro lado, uma ativação imprópria ou inadequada dos processos oxidativos pode estar presente cronicamente em situações patológicas, contribuindo para a injúria celular e tecidual.

O estresse oxidativo dentro da mitocôndria, tem sido associado com a idade, onde nucleotídeos oxidados têm demonstrado se acumular no cérebro e músculo com a idade (Mecocci et. al, 1999). Em adição a isso, inúmeros estudos têm relacionado a idade com reduções em genes de mRNA, associados à estrutura mitocondrial e funções do músculo esquelético e acúmulo de mutações no DNA mitocondrial (Tarnopolsky et. al, 2008).

Conseqüentemente, disfunções mitocondriais têm sido relacionadas com um espiral descendente, pelo qual, a elevada produção de ROS causa mais dano mitocondrial, disfunções mitocondriais e aumenta o estresse oxidativo.

Do ponto de vista químico, um radical livre (RL) é definido como qualquer

átomo, grupo de átomos ou molécula capaz de existir sob a forma independente, que contenha um ou mais elétrons desemparelhados (Del Maestro, 1980; Southorn, P. A. & Powis, G., 1988; Halliwell & Gutteridge, 1999). Essas substâncias são classificadas de forma mais abrangente como Espécies Reativas de Oxigênio (ROS = Reactive Oxygen Species) e Espécies Reativas do Nitrogênio (RNS = Reactive Nitrogen Species).

1.6.1. Fontes Oxidativas

De maneira geral, o oxigênio molecular (O₂) é necessário para a sobrevivência de todos os organismos aeróbicos. Assim, a obtenção de energia por estes organismos é feita através da fosforilação oxidativa. Porém, nem sempre o oxigênio se transforma completamente em água. Como consequência de sua configuração eletrônica, a molécula de oxigênio tem forte tendência, durante as reações, em receber um elétron de cada vez, formando uma série de intermediários tóxicos e reativos (Meneghini, 1987).

Os oxidantes mitocondriais podem exercer efeitos danosos e contribuem para o envelhecimento celular e doenças neurodegenerativas.

Aproximadamente 2-5% do fluxo de oxigênio através da mitocôndria não é completamente reduzido à água, gerando ROS (Boveris et. al, 1973), como ânions superóxido e radicais hidroxil. Sob condições normais, defesas antioxidantes, são capazes de prevenir dano oxidativo à moléculas biológicas incluindo lipídeos, aminoácidos e nucleotídeos (Cooper et. al, 2002).

1.7.Substâncias Antioxidantes

1.7.1.Creatina

A creatina (Cr) é um ácido orgânico, que é sintetizado endogenamente, predominantemente no fígado, a partir da glicina, arginina e metionina. A ingestão oral de Cr monoidratada, têm demonstrado um aumento de suas concentrações no plasma (Harris et. al, 1992) e melhora também sua concentração total (Greenhaff et. al, 1994), que é na sua maioria estocada como creatina fosfato (CrP), no músculo esquelético.

A Cr é transportada pelo sangue, para tecidos que requerem Cr, e captada pelas células com alta demanda de energia, por um transportador específico, SLC6A8. Esse transportador é expresso em todas as principais regiões do cérebro de mamíferos adultos (Guimbal and Kilimann, 1993; Schloss et al, 1994; Happe and Murrin, 1995; Saltarelli et al., 1996)

Além de suas propriedades ergogênicas, a Cr apresenta propriedades antioxidantes (direta e indiretamente) e tem mostrado reduzir a produção de RL e estresse oxidativo em modelos animais de várias doenças. Como o acúmulo de Ca^{2+} intracelular parece estar fortemente relacionado com a formação de ROS e dano oxidativo (Lin et. al, 2006) a suplementação de Cr tem o potencial de melhorar a homeostase de Ca^{2+} , reduzir a produção de ROS e diminuir o dano oxidativo. Em uma série controlada de estudos *in vitro*, Lawler et. al, demonstraram que a Cr foi eficiente em remover uma série de radicais, incluindo ânion superóxido. Mais recentemente, Cr exógena demonstrou remover ROS (incluindo radical hidroxil) assim como, espécies de nitrogênio em cultura de células humanas (Sestili et. al, 2006).

Estudos recentes mostram que a administração de Cr tem um potencial terapêutico para doenças neurodegenerativas com déficits de bioenergética, como as doenças de HD e PD (Gualano et al, 2010).

Existem inúmeras evidências que sugerem que a suplementação de Cr pode ser benéfica na prevenção e/ou tratamento de algumas doenças neuromuscular e cardiovasculares,

onde o estresse oxidativo está consistentemente associado, como HD (Ferrante et. al, 2000), PD (Matthews et. al, 1999), Esclerose lateral amiotrófica (Klivenyi et. al, 1999 e Zhang et. al, 2003) e outras desordens metabólicas (Royes et. al, 2006).

1.7.2.Piruvato

O piruvato (Pir) desempenha um papel importante no metabolismo intermediário, como um produto intermediário da glicólise e o substrato inicial do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Além disso, A remoção de H₂O₂ pelo Pir gerado endógenamente, provavelmente é a defesa celular chave contra o estresse oxidativo, particularmente na proliferação celular (Brand, 1997 e Brand et al., 1997). Em função de sua habilidade de remover ROS, o Pir tem sido extensivamente estudado como um agente citoprotetor. Andrae et al. (1985), demonstraram que o Pir e alguns outros alfa-cetoácidos de cadeia longa, são capazes de proteger culturas de células contra os efeitos letais do H₂O₂.

O Pir protege contra o estresse oxidativo e insulto mitocondrial pela sua habilidade de servir de substrato energético neuronal efetivo para glicólise e atuar como excepcional e poderoso antioxidante (Mazzio et al., 2003).

O Pir contraria a diminuição no conteúdo de ATP neuronal induzida por NMDA, indicando que ele pode proteger neurônios, normalizando a carga de energia celular. Além disso, ele previne o acúmulo de glutamato que é neurotóxico após a pré exposição de neurônios a NMDA (Maus et al., 1999).

1.8. Campo Aberto e any-maze

O Campo aberto é o teste comportamental mais amplamente usado na psicologia animal (Walsh e Cummins, 1976). Tem sido bastante utilizado para medir a ansiedade, assim como atividade locomotora e exploratória.

Nesse teste o animal é colocado numa arena plana e iluminada (Genaro et al., 2000) e observado por um curto período de exposição (Eilam, 2002). O Comportamento no campo aberto em roedores, é comumente considerado um índice fundamental de seu comportamento geral. Atualmente a análise de inúmeros parâmetros é possível, devido à um programa de computador acoplado a um sistema de câmeras que vêm sendo largamente usado na busca de que as tarefas comportamentais sejam melhor exploradas pelos pesquisadores. O Any-maze é um sistema de monitoramento de vídeo desenvolvido para automatizar testes em experimentos comportamentais.

2. OBJETIVOS

Considerando os efeitos tóxicos apresentados pelo triptofano e seus metabólitos, relacionados com diversas patologias, tais como a hipertriptofanemia e doenças neurodegenerativas, tais como, HD e PD, e os conhecidos efeitos antioxidantes da Cr e Pir, os objetivos desse estudo são:

1. Investigar o efeito *in vivo* do Trp e/ou seus metabólitos, sobre parâmetros comportamentais em animais submetidos a tarefa de campo aberto
2. Investigar o efeito *in vivo* do Trp e/ou seus metabólitos sobre parâmetros de estresse oxidativos, no hipocampo.
3. Investigar o possível efeito antioxidantes da Cr e Pir sobre os efeitos do Trp nos parâmetros comportamentais.
4. Investigar o possível efeito antioxidante da Cr e Pir sobre os efeitos do Trp nos parâmetros de estresse oxidativo.

ARTIGO

Artigo Submetido à Revista “Molecular and Cellular Biochemistry”

Creatine and pyruvate prevent behavioral and oxidative stress alterations caused by hypertryptophanemia in rats

Vivian Strassburger Andrade¹, Denise Bertin Rojas¹, Lenise Oliveira¹, Mychely Lopes Nunes¹,
Fernanda Luz de Castro¹, Cristina Garcia¹, Tanise Gemelli¹, Rodrigo Binkowski de Andrade¹,
Clóvis Milton Duval Wannmacher¹

¹Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

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

Running title: Creatine, pyruvate and hypertryptophanemia

Abstract

It is known that the accumulation of tryptophan and its metabolites is related to brain damage associated with both hypertryptophanemia and neurodegenerative diseases. In this work, we investigated the effect of tryptophan administration on various parameters of behavior in the open field task and oxidative stress, and the effects of creatine and pyruvate, on the effect of tryptophan. Forty, sixty-day-old male Wistar rats, were randomly divided into 4 groups: saline; tryptophan; pyruvate + creatine; pyruvate + creatine. Animals received 3 subcutaneous injections of tryptophan (2 $\mu\text{mol/g}$ body weight each one at 3 h of intervals) and/ or pyruvate (200 $\mu\text{g/g}$ body weight 1 h before tryptophan) and/or 400 $\mu\text{g/g}$ body weight twice a day for 5 days before tryptophan twice a day for 5 days before training; controls received saline solution (NaCl 0.85 g%) at the same volumes (30 $\mu\text{L/g}$ body weight) than the other substances. Results showed that tryptophan increased the activity of the animals, suggesting a reduction in the ability of habituation to the environment. Tryptophan induced increase of TBA-RS and total sulfhydryls. The effects of tryptophan in the open field, and in oxidative stress were fully prevented by the combination of creatine plus pyruvate. In case these findings also occur in humans affected by hypertryptophanemia or other neurodegenerative disease in which tryptophan accumulates, it is feasible that oxidative stress may be involved in the mechanisms leading to the brain injury, suggesting that creatine and pyruvate supplementation could benefit patients affected by these disorders.

Keywords: tryptophan; creatine; pyruvate; open field; oxidative stress

Introduction

Tryptophan (Trp), an essential amino acid, is converted to several compounds, namely kynurenines (formylkynurenine, kynurenine, and 3-hydroxykynurenine), serotonin, indolic acids (indolepyruvic acid, indoleacetic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid, and

indoleacetylglutamine), and nicotinic acid (niacin) compounds (nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) and nicotinamide). Under normal conditions, very little Trp appears to be converted to nicotinic acid (1).

The kynurenine pathway is the major route of L-tryptophan catabolism leading to production of 3-hydroxykynurenine (3-HK) as a metabolic intermediate (2 - 4). Increased content of 3-HK was found in the brain of patients with pathological conditions, such as dementia associated with human immunodeficiency virus (HIV) infection (5) and hepatic encephalopathy (6) suggesting that 3-HK might be neurotoxic. This compound, but not the others metabolites of the kynurenine pathway inhibits the creatine kinase (CK) activity of the brain cortex from Wistar rats (7).

There are several evidences that the kynurenine pathway is involved in the pathophysiology of Alzheimer's disease (AD)(8). Patients with major cognitive impairment present high serum kynurenine and low levels of kynurenic acid in cerebrospinal fluid (9 - 12). Increased level of 3-HK were found in the putamen, frontal and temporal cortex of post-mortem Huntington's disease (HD) patients, but not in the brains of AD patients (13, 14).

The increased catabolism of Trp in AD disease can lead to deficiency of this amino acid and may have an important role in the pathogenesis of the disease (15, 9, 10). Sleep disorders and mood observed in the disease may be related to increased catabolism of Trp by the kynurenine pathway, limiting the availability of Trp for the synthesis of serotonin (15 - 17).

Congenital defects of Trp metabolism are comparatively rare (18), although at least 12 patients with apparent defects in Trp catabolism have been reported (1). Previous studies, have described the case of an 9-year-old girl characterized by dwarfism, mental impairment, photosensitive rash, and ataxia. This patient had mildly elevated Trp concentrations in both urine and plasma (19). Trp loading increased excretion of the amino acid, while the concomitant excretion of kynurenic compounds was reduced.

Snedden et al. (1983) have described two sibs who had markedly increased Trp and reduced kynurenine concentrations in plasma and urine. The behavior of the sister, like that of the brother, was characterized by moderate mental retardation, abrupt changes of mood from

cheerfulness and affection, to marked hostility and depression. Trp was elevated in both plasma (10-fold the normal levels) and urine. A block in the conversion of Trp to kynurenine was postulated, but enzyme studies to confirm the block were not performed. Mild and moderate mental retardation with exaggerated affective responses, periodic mood swings, and apparent hypersexual behavior were reported in two siblings with hypertryptophanemia and tryptophanuria (20). The massive excretion of indoleacetic, indolelactic and indolepyruvic acids indicated that abnormally large amounts of Trp were being metabolized by the transamination pathway. The occurrence in siblings and the presence of abnormal urinary Trp metabolites in the mother and a half-sibling suggested that the condition results from an autosomal recessive gene with minor expression in heterozygotes. They suggested a block in the initial conversion of Trp to kynurenine, but enzyme studies were not done.

Because energy is necessary to maintain the development and regulation of cerebral functions, it has been postulated that alteration in CK activity may represent an important step of a neurodegenerative pathway that leads to neuronal loss in the brain (21). Recent findings have reinforced this hypothesis, showing that CK activity is severely reduced in some neurodegenerative diseases (22, 23). Recent studies have shown that creatine (Cr) administration has a therapeutic potential for neurodegenerative disorders with bioenergetic deficits like HD or Parkinson's disease (PD) (24).

Cr is transported by blood to Cr-requiring tissues and taken up in cells with high energy demand by a Cr specific transporter, SLC6A8. This transporter is expressed throughout the main regions of adult mammalian brain, particularly in those associated with learning, memory and general limbic functions (25 - 28).

The creatine/phosphocreatine/creatine kinase (Cr/PCr/CK) system plays essential roles to maintain the high energy levels necessary for central nervous system (CNS) (29). Different studies showed that CK isoforms are found highly concentrated in cerebellum (especially glomeruli structures of granular layer), choroid plexus and hippocampal granular and pyramidal cells (30). It must be noted that hippocampus is important for learning and memory function and can be severely affected in AD. Troubles in CNS energy metabolism due to mitochondrial

dysfunction, either from oxidative stress, mitochondrial DNA deletions, pathological mutations or altered mitochondria morphology, play critical roles in the progression of neurological diseases as a primary or secondary mechanism in neuronal death cascade (31, 32).

Pyruvate (Pyr) 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 Pyr is probably a key cellular defense against oxidative stress, particularly in proliferating cells (33, 34). In view of its ability to scavenge reactive oxygen species (ROS), Pyr has been studied extensively as a cytoprotective agent. Andrae et al. (1985) demonstrated that Pyr and some other related longer chain alpha-ketoacids are capable of protecting cultured cells against the lethal effects of H₂O₂. Hydrogen peroxide, a byproduct of oxidative stress, has been implicated to trigger apoptosis in various cell types (36 - 38) leading to major neurodegenerative diseases, such as AD, PD and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Pyr protects 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 (39).

Previous studies showed that Trp, at 0.5 mM concentrations, in the range of the levels found in the plasma of hypertryptophanemic patients, inhibited in vitro the activities of the thiol-containing enzymes pyruvate kinase (PK) (40) and CK (41), and promoted oxidative stress in brain cortex of rats (42).

Therefore, considering that Trp and oxidative stress is involved in the brain dysfunction of various common neurodegenerative disorders (43 - 45), and that Trp inhibits CK and PK activities, in the present work we investigated the influence of Trp and/or Cr + Pyr administration on some parameters of rat behavior in the open field task and of oxidative stress.

Materials and methods

Animals

A total of 40 sixty-day-old male Wistar rats (180–230 g) from our own breeding stock of the Central Animal House of the Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS were used for

the behavioral experiments. The animals were housed four per cage with food and water freely available under a 12 : 12 h light/ dark cycle (lights on 07:00 – 19:00 hours) at a constant temperature ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) colony room, with free access to water and a commercial chow (Supra, Porto Alegre, RS, Brazil) containing 20,5% protein (predominantly soybean supplemented with methionine), 54% carbohydrate, 4,5%, fiber 4%, lipid 7% ash and 10% moisture. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, and followed the “Principles of laboratory animal care” (NIH publication no. 85-23, revised 1985). All experimental protocols were designed carefully in order to keep the number of animals used to a minimum, as well as their suffering. All efforts were made to minimize animal suffering and to use only the number of animals necessary to produce reliable scientific data.

Treatment

Forty Sixty-day-old male Wistar rats were randomly divided into 4 groups: saline; Trp; Pyr + Cr; Trp + Pyr + Cr. The animals received 3 subcutaneous injections of Trp ($2 \mu\text{mol/g}$ body weight each one at 3 h of intervals) (46) and/ or Pyr ($200 \mu\text{g/g}$ body weight 1 h before tryptophan) (47), and/or Cr ($400 \mu\text{g/g}$ body weight twice a day for 5 days before tryptophan) (48) twice a day for 5 days before training; controls received saline solution (NaCl 0.85 g%) at the same volumes ($30 \mu\text{L/g}$ body weight) than the other substances. All drugs were dissolved in 0.85% NaCl solution, and pH of the solutions was buffered to 7.4 with NaOH or HCl. All behavioral tests were carried out between 60 and 65 days of age. All behaviors were recorded by a videotape with an overheadcamera for subsequent analysis. During the analysis of the open field, the image of the floor of the arena divided into squares was used to record of the number of squares entered by an animal as well as the exact place of occurrence of the recorded behaviors. The animals were killed after behavioral test by decapitation without anesthesia, and the brain was rapidly removed for the determination of the parameters of oxidative stress. Doses of were administered according to body weight and calculated from the pharmacokinetic parameters determined in our laboratory (46).

Open-field habituation

The open-field exploration was carried out as previously described (49). Five days before the beginning of the chronic treatment, the animals were submitted to the open field. The device consists of a wooden box, round two feet in diameter and with walls of MDF. The rats were gently placed in the box, with nose facing the corner of the box, and were monitored for fifteen minutes. The number of rearings (stand on two legs), the number of crossings (go with all four paws from one quadrant to another) and the distance traveled were counted to assess the exploratory behavior of the animals, a measure of the habituation to the open field environment. The number of groomings (pass front paws on the snout) was recorded to evaluate emotionality of the animals (50 - 52)

Preparation of Brain Tissue

After decapitation the brain was rapidly excised on a Petri dish placed on ice. The olfactory bulbs, pons, medulla and cerebellum were discarded and the cerebral hippocampus was dissected, weighed and homogenized in ten volumes (1:10, *w/v*) of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7,4 containing 140 mM KCL. Homogenates were centrifuged at 750 x *g* for 10 min at 4°C to discard nuclei and cell debris (53, 54). The pellet was discarded and the supernatant, a suspension of mixed and preserved organelles, including mitochondria, was separated and immediately used for the analyses.

Oxidative stress measurements

Thiobarbituric acid-reactive species (TBA-RS)

TBA-RS measures mainly malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation caused mainly by hydroxyls free radicals. Hydroxyl free radicals are mainly formed from H₂O₂ by the iron-catalyzed Fenton reaction or by the Haber-Weiss reaction (55). TBA-RS were measured, as described previously (56). Briefly, to glass tubes samples and reagents were added in the following order: 500 µL of tissue supernatant; 50 µL of SDS 8.1%; 1500 µL of 20% acetic acid in aqueous solution (*v/v*) pH 3.5; 1500 µL of 0.8% thiobarbituric acid; and 700 µL of

distilled water. The mixture was vortexed and the reaction was carried out in a boiling water bath for 1 h. The mixture was allowed to cool on water for 5 min, and was centrifuged at 750 x g for 10 min. The resulting pink stained TBA-RS were determined spectrophotometrically at 532 nm. A calibration curve was generated using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as a standard. TBA-RS were calculated as nmol of TBA-RS per mg of protein.

Total sulfhydryl content

The sulfhydryl assays were performed according to a previously published method (57), where the reduction of 5,50-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, generating a yellow derivative (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm. Briefly, 0.1 mM DTNB was added to 120 μ l of hippocampus supernatants. This was followed by a 30-min incubation at room temperature in a dark room. Absorption was measured at 412 nm. The sulfhydryl content is inversely correlated to oxidative damage to proteins. Results were calculated as nmol of TNB per mg of protein.

Statistical analysis

Data from oxidative stress measures were expressed as mean \pm SD and were analyzed by two-way ANOVA (Trp and Cr + Pyr as factors). Comparison between means was analyzed by one-way ANOVA followed by the Tukey test when the F value was significant. Data from the open field task were expressed as median and 75 percentil. Comparisons among groups were performed using Kruskal-Wallis analysis of variance followed by Mann-Whitney U test when the values of the Kruskal-Wallis analysis were significant. P <0.05 values were considered significant. Statistical analysis were performed using the statistical software package SPSS.

Results

First, we investigated the effects of Trp and Cr + Pyr administration on the behavioral parameters of the open field task. Kruskal Wallis test was significant for the number of crossings (Chi-Square (1) = 5.60; p<0.01) (Fig 1), the number of rearings (Chi-Square (1) =

6.92; $p < 0.01$) (fig 2) and the distance traveled (Chi-Square (1) = 6.56; $p < 0.01$) (Fig 3), but not for the number of grooming (Chi-Square (1) = 0.28; $p > 0.60$) (Fig 4). Comparison between the groups by Mann Whitney test indicated that Trp administration increased all parameters of exploratory behavior and that Cr + Pyr administration fully prevented the effects of Trp. These results indicate that Trp interferes in the process of habituation to the open field and the association of Cr and Pyr protects the process of habituation (learning/memory).

Next, we investigated the effects of Trp and/or Cr + Pyr administration on some oxidative stress parameters in brain hippocampus of adult rats. Two-way ANOVA showed significant interaction between Trp and Cr + Pyr for TBA-RS ($F(1,23) = 10.05$; $p < 0.05$) and for total sulfhydryls ($F(1,22) = 6.94$; $P < 0.01$). One-way ANOVA followed by the Tukey test showed that Trp administration significantly increased TBA-RS (Fig 5) and decreased total sulfhydryls content of hippocampus (Fig 6) and that administration of Cr + Pyr fully prevented the effects of Trp. These results suggest that Trp caused deficit of habituation by mechanisms involving deficit of energy and/or oxidative stress.

Discussion

The present study showed that administration of Trp causes deficit of learning/memory of rats in a classical behavioral task, the open field, and that this deficit can be prevented by Pyr and Cr pre-treatment.

Animals receiving Trp one hour before training presented no habituation as revealed by the lack of reduction of exploratory activity (distance traveled, number of rearings and of crossings responses) along the 15 min of the session in the open field task, whereas the controls (saline and Cr + Pyr) showed normal habituation (reduction of exploratory behavior). Memory retention or habituation to a novel environment can be measured by reduction of the exploratory behavior along the session in this task, in which the hippocampus plays a crucial role (58). Since a progressive reduction of the exploratory activity can be interpreted to indicate that animals recognize and remember the environment and in the present study Trp-treated animals did not show this pattern, it is assumed that this reflects a deficit of learning/memory caused by

this amino acid.

When administration of Trp was preceded by Cr treatment for 5 days plus Pyr one hour before the animals were subjected to the open field task, it was observed that there was reduction of number of crossing and rearing responses along the session. Trp and Pyr + Cr did not interfere in the number of groomings in the open field task, since all groups of animals behaved similarly along the session. Therefore, it seems that alterations of emotionality possibly did not contribute to the deficit of habituation caused by Trp. These results suggest that Pyr and Cr could be possible substances capable to prevent Trp-induced behavioral alterations, suggesting a possible relation between inhibition of activities of PK and CK in the behavioral alterations caused by Trp.

In the present investigation, Trp administration induced increase of TBA-RS and reduction of total sulfhydryls content in hippocampus, indicating induction of oxidative stress. We also observed that the increase of TBA-RS and the diminution of total sulfhydryls were totally prevented by Cr plus Pyr pretreatment, two potent antioxidants, reinforcing the hypothesis of oxidative stress.

Oxidative damage may occur when there is oxidative stress, namely an imbalance between free radical generation and scavenging systems. The brain may be particularly vulnerable to increased reactive species, due to its high rate of oxidative metabolic activity, high content of polyunsaturated fatty acids, regions rich in iron concentration, and moderate levels of antioxidant defenses compared to other tissue (59, 60).

Pyr exerts powerful neuroprotective properties by providing simultaneous resistance to oxidative stress and mitochondrial insult because Pyr is an effective neuronal energy substrate from glycolysis and acts as a powerful antioxidant (61). Pyr counteract the decrease in the neuronal ATP content induced by N-Methyl-D-aspartate (NMDA), indicating that it might protect neurons by normalizing cellular energy charge. Besides, pyruvate prevents the accumulation of glutamate which is neurotoxic after a pre-exposure of neurons to NMDA (62).

Cr has directly anti-oxidative properties (63). Patients with Cr deficiency syndromes present with mental retardation, speech and language delay, and epilepsy. Patients with Cr

transporter deficiency may exhibit autistic behavior, mental retardation with learning problems (64). The common denominator of these disorders is the depletion of the brain creatine pool, as demonstrated by *in vivo* proton magnetic resonance spectroscopy (65).

Trp accumulation in blood and urine seems to be a rare condition. Nevertheless, the few described cases present severe neurological alterations, whose pathophysiology is unknown. Trp loading induces lipoperoxidation in healthy humans (66) and in rats (67, 42). These data are in agreement with other present results that showed increased TBA-RS and decreased total sulfhydryls content in the hippocampus of Trp-treated rats. Previous studies from our laboratory showed that Trp and some of their metabolites inhibits the *in vivo* activity of the thiol-containing enzymes CK and PK and induces oxidative stress in rat brain (46, 41, 67, 42). Inhibition of CK and PK alters energy homeostasis and diminishes Cr and Pyr concentrations in the brain. Studies from several laboratories have shown that a major contributor to the pathogenesis of neurodegenerative disorders may be impairment of cellular energy metabolism (68 - 71) and oxidative stress (72). Nakagami et al. (1996), reported the production and accumulation of ROS by 3-HK. In a previous study, was demonstrated that tryptophan decreases *in vitro* and *in vivo* PK and CK activities in the brain cortex of developing rats, possibly compromising brain energy production (46, 41).

In the present study we demonstrated that administration of Trp compromises the process of habituation to the open field of rats and induces oxidative stress in their hippocampus and that the two alterations are prevented by pre-treatment with Cr plus Pyr, suggesting that the neurotoxicity of Trp involves oxidative stress and alteration of energy homeostasis. Matthews et al. proposed that Cr supplementation provides direct or indirect antioxidant protection against metabolic damage with HD. Cr supplementation has been shown potential to be efficacious in treatment of oxidative stress and damage with pathologies that result in muscle wasting (75).

Further studies are needed to assess how the Trp is causing this damage, if caused by the accumulation of itself or their metabolites. Besides, more studies are necessary to evaluate whether Cr and Pyr may be possible substances to be supplemented to patients with hypertryptophanemia or neurodegenerative diseases.

Acknowledgements

We are grateful for the financial support of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and FINEP Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net).

References

1. Levy HL (2001) Hartnup disorder. In: Scriver, CR., Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds.): *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 1667–1724
2. Okuda S, Nishiyama N, Saito H, Katsuki H (1996) Hydrogen peroxide-mediated neuronal cell death induced by an endogenous neurotoxin, 3-hydroxykynurenine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:12553–12558
3. Heyes MP (1996) The kynurenine pathway and neurological disease. Therapeutic strategies. *Adv. Exp. Med. Biol.* 398:125–129
4. Stone TW (2001) Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. *Progr. Neurobiol.* 64:185–218
5. Sardar AM, Bell JE, Reynolds GP (1995) Increased concentrations of the neurotoxin 3-hydroxykynurenine in the frontal cortex of HIV-1-positive patients. *J. Neurochem.* 64:932–935
6. Pearson SJ, Reynolds GP (1991) Determination of 3-hydroxykynurenine in human brain and plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Increased concentrations in hepatic encephalopathy. *J. Chromatogr.* 565:436–440
7. Cornelio AR, Rodrigues-Junior Vda S, Rech VC, de Souza Wyse AT, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wannmacher CM (2006) Inhibition of creatine kinase activity from rat cerebral cortex by 3-hydroxykynurenine. *Brain Res.* 8;1124(1):188-96
8. Guillemin GJ, Brew BJ (2002). Implications of the kynurenine pathway and quinolinic acid in Alzheimer's disease. *Redox Report* 7:1-8.
9. Widner B, Leblhuber F, Walli J, Tilz GP, Demel U, Fuchs D (1999). Degradation of tryptophan in neurodegenerative disorders. *Adv Exp Med Biol* 467:133–138.
10. Widner B, Leblhuber F, Walli J, Tilz GP, Demel U, Fuchs D (2000) Tryptophan degradation and immune activation in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 107:343–353.
11. Baran H, Jellinger K, Deecke L. (1999) Kynurenine metabolism in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 106: 165–181.
12. Heyes MP, Saito K, Crowley JS (1992) Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism

- in inflammatory and noninflammatory neurological disease. *Brain* 115: 1249–1273
13. Pearson SJ and Reynolds GP (1992) Increased brain concentration of a neurotoxin, 3-hydroxykynurenine, in Huntington's disease. *Neurosci. Lett.* 144: 199–201
 14. Guidetti P, Reddy H, Tagle DA, Schwarcz R (2000) Early kynurenergic impairment in Huntington's Disease and in a transgenic animal model. *Neurosci. Lett.* 282: 233–235
 15. Maurizi CP (1990) The therapeutic potential for tryptophan and melatonin: possible roles in depression, sleep, Alzheimer's disease and abnormal aging. *Med Hypotheses* 31: 233–242
 16. Widner B, Ledochowski M, Fuchs D (2000) Sleep disturbances and tryptophan in patients with Alzheimer's disease. *Lancet* 355: 755–756
 17. Porter RJ, Lunn BS, Walker LL, Gray JM, Ballard CG, O'Brien JT (2000) Cognitive deficit induced by acute tryptophan depletion in patients with Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry* 157: 38–640
 18. Snedden W, Mellor CS, Martin JR (1983) Familial hypertryptophanemia, tryptophanuria and indolketonuria. *Clin. Chim. Acta.* 131: 247–256
 19. Tada K., Ito H, Wada Y, Arakawa T (1963) Congenital tryptophanuria with dwarfism ("H" disease-like clinical features without indicanuria and generalized aminoaciduria): a probably new inborn error of tryptophan metabolism. *Tohoku J. Exp. Med.* 80:118–134
 20. Martin IR, Mellor CS, Fraser FC (1995) Familial hypertryptophanemia in two siblings. *Clin. Gen.* 47: 180–183
 21. Tomimoto H., Yamamoto K., Homburger HA, Yanagihara T (1993) Immunoelectron microscopic investigation of creatine kinase BB-isoenzyme after cerebral ischemia in gerbils. *Acta Neuropathol.* 86:447–455
 22. David SS, Shoemaker M, Haley BE (1998) Abnormal properties of creatine kinase in Alzheimer's disease brain: correlation of reduced enzyme activity and active site photolabelling with aberrant cytosol-membrane partitioning. *Mol. Brain Res.* 54:276–287
 23. Aksenov M, Aksenova M, Butterfield AD, Markesbery WR (2000) Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer's disease brain. *J. Neurochem.* 74: 2520–2527
 24. Gualano B, Artioli GG, Poortmans JR and Lancha AH (2010) Exploring the therapeutic role

of creatine supplementation *Amino Acids* 38:31–44

25. Guimbal C. and Kilimann MW (1993) A Na(+)-dependent creatine transporter in rabbit brain, muscle, heart, and kidney CDNA cloning and functional expression. *J. Biol. Chem.* 268:8418– 8421

26. Schloss P, Mayser W and Betz H (1994) The putative rat choline transporter CHOT1 transports creatine and is highly expressed in neural and muscle-rich tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 198:637–645

27. Happe HK and Murrin LC (1995) In situ hybridization analysis of CHOT1, a creatine transporter, in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol* 351:94–103

Hemmer W and Wallimann T (1993) Functional aspects of creatine kinase in brain *Dev. Neurosci.* 15:249–260

28. Saltarelli MD, Bauman AL, Moore KR, Bradley CC and Blakely RD (1996) Expression of the rat brain creatine transporter in situ and in transfected HeLa cells *Dev. Neurosci.* 18:524–534.

29. Wyss M and Kaddurah-Daouk R (2000) Creatine and creatinine metabolism. *Physiol. Rev.* 80:1107–1213

30. Hemmer W, Zanolla E, Furter-Graves EM, Eppenberger HM and Wallimann T (1994) Creatine kinase isoenzymes in chicken cerebellum: specific localization of brain-type creatine kinase in Bergmann glial cells and muscle-type creatine kinase in Purkinje neurons. *Eur. J. Neurosci.* 6:538–549

31. Beal MF, Palomo T, Kostrzewa RM, Archer T (2000) Neuroprotective and neurorestorative strategies for neuronal injury *Neurotox Res.* 2 (2-3):71-84

32. Chaturvedi RK, Beal MF (2008) Mitochondrial approaches for neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* 1147:395-412. Review

33. Brand K. (1997) Aerobic glycolysis by proliferating cells: protection against oxidative stress at the expense of energy yield. *J Bioenerg Biomembr.* 29:355–64

34. Brand K A, Hermfisse U (1997) Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J.* 11:388–95

35. 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.* 28:93–8
36. Clement MV, Ponton A, Pervaiz S (1998) Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu. *FEBS Lett.* 440:13 18
37. 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
38. 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
39. Mazziro EA, Soliman KF (2003) Cytoprotection of pyruvic acid and reduced beta-nicotinamide adenine dinucleotide against hydrogen peroxide toxicity in neuroblastoma cells. *Neurochem Res.* 28(5):733-41
40. Feksa LR, Cornelio A, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM (2005) The effects of the interactions between amino acids on pyruvate kinase activity from the brain cortex of young rats *Int J Dev Neurosci* 23(6):509-14
41. Cornelio AR, Rodrigues V Jr, de Souza Wyse AT, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wannmacher CM (2004) Tryptophan reduces creatine kinase activity in the brain cortex of rats *Int J Dev Neurosci.* 22(2):95-101
42. Feksa LR, Latini A, Rech VC, Feksa PB, Koch GD, Amaral MF, Leipnitz G, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wannmacher CM (2008) Tryptophan administration induces oxidative stress in brain cortex of rats. *Metb Brain Dis.* 23(2):221-33
43. Reznick AZ, Witt EH, Silbermann M, Packer L (1993) The threshold of age in exercise and antioxidants action 62:423-7. Review
44. Méndez-Alvarez E, Soto-Otero R, Hermida-Ameijeiras A, López-Martín ME, Labandeira-

- Garcia JL (2001) Effect of iron and manganese on hydroxyl radical production by 6-hydroxydopamine: mediation of antioxidants. *Free Radic Biol Med.* 31(8):986-98
45. Karelson E, Bogdanovic N, Garlind A, Winbland B, Zilmer K, Kullisaar T, Vihalemm T, Kairane C, Zilmer M (2001) The cerebrocortical areas in normal brain aging and in Alzheimer's disease: noticeable differences in the lipid peroxidation level and in antioxidant defense. *Neurochem Res.* 26(4):353-61
46. Feksa LR, Cornelio A, Vargas CR, de Souza Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM. (2003) Alanine prevents the inhibition of pyruvate kinase activity caused by tryptophan in cerebral cortex of rats. *Met Brain Dis.* 18(2):129-37
47. Ryu JK, Choi HB, Mclarnon JB (2006) Combined minocycline plus pyruvate treatment enhances effects of each agent to inhibit inflammation, oxidative damage, and neuronal loss in an excitotoxic animal model of Huntington's disease. *Neurosci* 141:1835–1848
48. Stöckler S, Holzbach U, Hanefeld F, Marquardt I, Helms G, Requart M, Hänicke W, and Frahm J (1994) Creatine deficiency in the brain: a new, treatable Inborn Error of Metabolism. *Pediatric Research* 36: 409-413
49. Eilam, David (2002) Open-Field behavior withstands drastics changes in arena size. *Behavioural Brain Research* 142: 53-62
50. Walsh RN, Cummins RA (1976) The open-field test: A critical review. *Psychol Bull* 83:482-504
51. Archer J (1973) The influence of testosterone on chick behavior in novel environments 8(1):93-108
52. Elias JW, Bell RW (1975) Open fiels interpretation: social status and social vs. spatial stimulation as factors *J Gen Psychol.* 92(2d Half):293-4
53. Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S (1985) Comparisons of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice *Tumori* 71, 241-249
54. González-Flecha B, Llesuy S, Boveris A (1991) Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle *Free*

55. Kehrer JP (2000) Cause-effect of oxidative stress and apoptosis. *Teratology* 62(4):235-6.
Review
56. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction *Anal Biochem.* 95(2):351-8
57. Aksenov MY, Aksenova MV, Butterfield DA, Geddes JW, Markesbery WR. (2001) *Neuroscience* 103(2):373-83
58. Denenberg VH (1969) Open-field behavior in the rat: what does it mean? *Ann N Y Acad Sci* 30;159(3):852-9
59. Halliwell B, Gutteridge JMC (1996) Oxygen radicals and nervous system. *Trends Neurosci.* 8,22-26
60. Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) In: Halliwell, B, Gutteridge J. M. C. (Eds.), *Free Radical in Biological and Medicine.* Oxford University Press, Oxford, pp. 188-276
61. Mazzi E, and Soliman KFA (2002) Antioxidant systems through the glycolytic flux via accumulation of pyruvic acid and b-nicotinamide adenine dinucleotide – protection against peroxide in neuroblastoma cells. *Neurochem. Res.*, In Print.
62. Maus M, Marin P, Israël M, Glowinski J, Prémont J (1999) Pyruvate and lactate protect striatal neurons against n-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci* 11(9):3215-24
63. Lawler JM, Barnes WS, Wu G, Song W, Demaree S (2002) Direct antioxidant properties of creatine *Biochem Biophys Res Commun* 11;290(1):47-52
64. Hahn KA, Salomons GS, Tackels-Horne D, Wood TC, Taylor HA, Schroer RJ, Lubs HA, Jakobs C, Olson RL, Holden KR, Stevenson RE, Schwartz CE. *Am J Hum Genet* 70(5):1349-56
65. Nasrallah F, Feki M, Kaabachi N (2010) Creatine and creatine deficiency syndromes: biochemical and clinical aspects, *Pediatr Neurol.* 42(3):163-71. Review
66. Forrest CM, Mackay GM, Stoy N, Egerton M, Christofides J, Stone TW, Darlington LG. (2004) Tryptophan loading induces oxidative stress. *Free Radical Res.* 38:1167-1171
67. Feksa LR, Latini A, Rech VC, Wajner M, Dutra-Filho CS, de Souza Wyse AT, Wannmacher

CM. (2006) *Neurochem Int* 49(1):87-93

68. Beal, MF, (1992) Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illness? *Ann. Neurol.* 31:119–130

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

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

71. Hodgkins PS, Schwarcz R (1998) Interference with cellular energy metabolism reduces kynurenic acid formation in rat brain slices: reversal by lactate and pyruvate *Eur. J. Neurosci.* 10:1986–1994

72. Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262:689–695

73. Nakagami Y, Saito H, Katsuki H (1996) 3-Hydroxykynurenine toxicity on the rat striatum in vivo. *Jpn. J. Pharmacol.* 71:183–186

74. Matthews RT, Yang L, Jenkins BG, Ferrante RJ, Rosen BR, Kaddurah-Dauok R, and Beal MF (1998) Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. *J. Neurosci.* 18:156-163

75. Strong MJ and Pattee GL (2000) Creatine and coenzyme Q10 in the treatment of ALS *Amyotrophic Lateral Sclerosis Other Motor Neuron Disorders* 1:17-20

Figuras e legendas do artigo

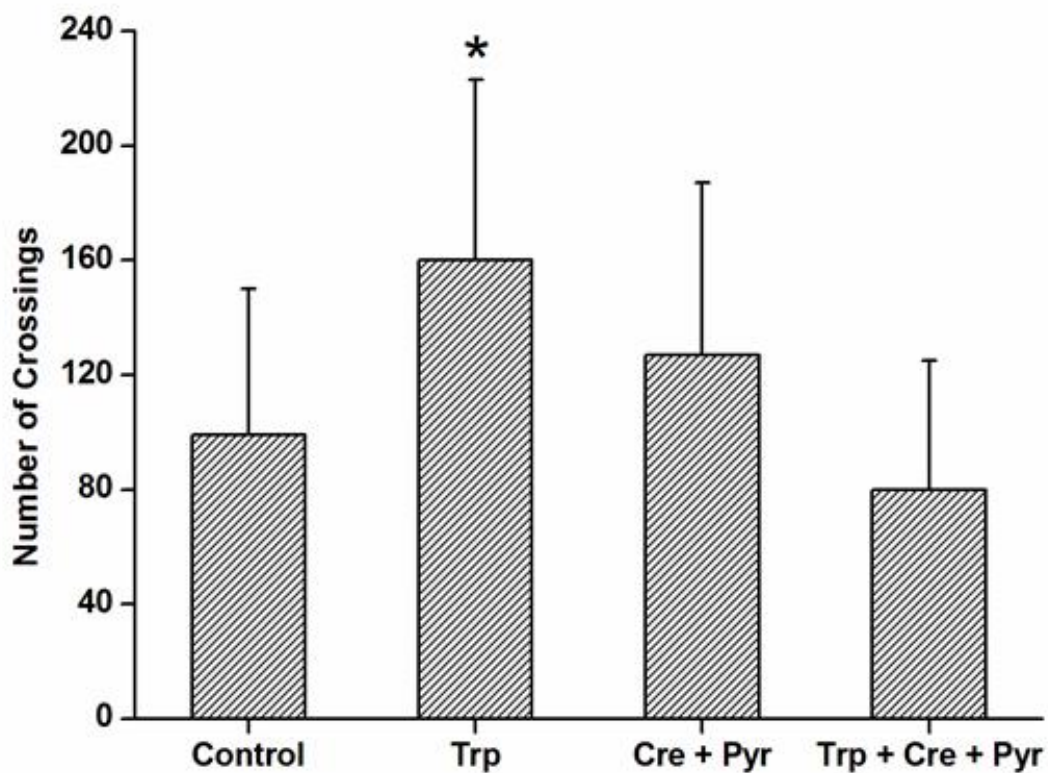


Figure 1. Preventive effect of the association of creatine (Cre) and pyruvate (Pyr) on the increase of the number of crossings caused by tryptophan (trp) administration to rats in the open field task

Data are median and 75 percentil for 8-10 animals in each group. Animals were left to freely explore the arena for 15 min. * $P < 0.01$ compared to the other groups (Kruskal-Wallis ANOVA followed by the Mann-Whitney test).

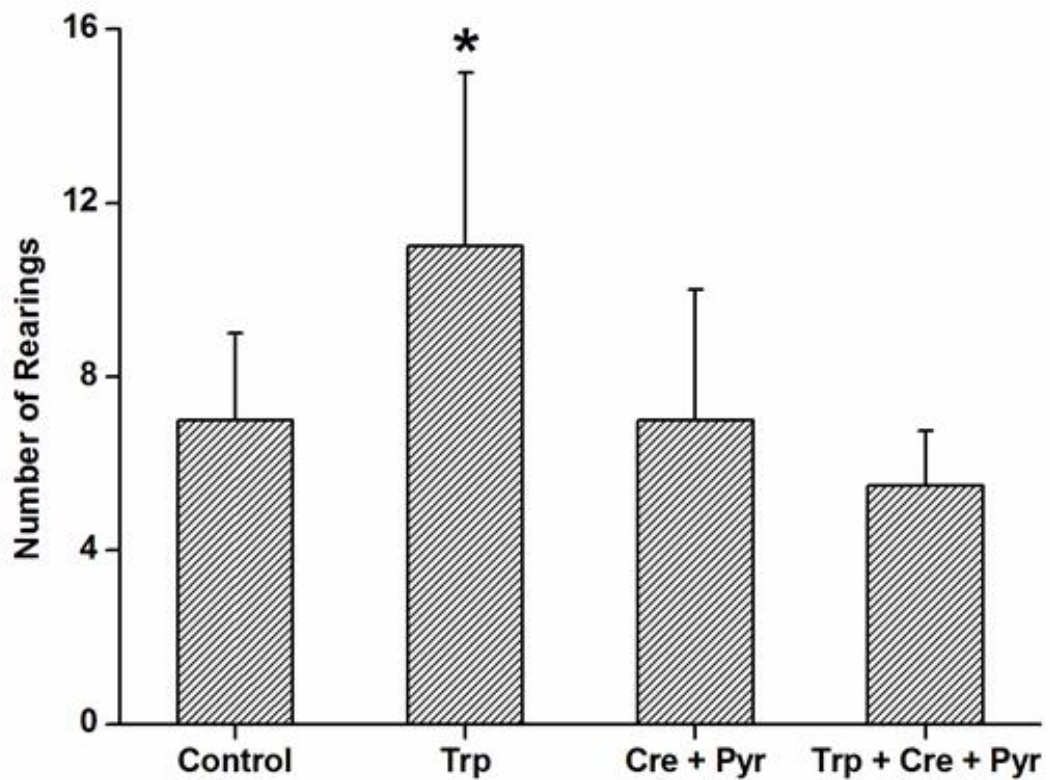


Figure 2. Preventive effect of the association of creatine (Cre) and pyruvate (Pyr) on the increase of the number of rearings caused by tryptophan (trp) administration to rats in the open field task

Data are median and 75 percentil for 8-10 animals in each group. Animals were left to freely explore the arena for 15 min. *P< 0.01 compared to the other groups (Kruskal-Wallis ANOVA followed by the Mann-Whitney test).

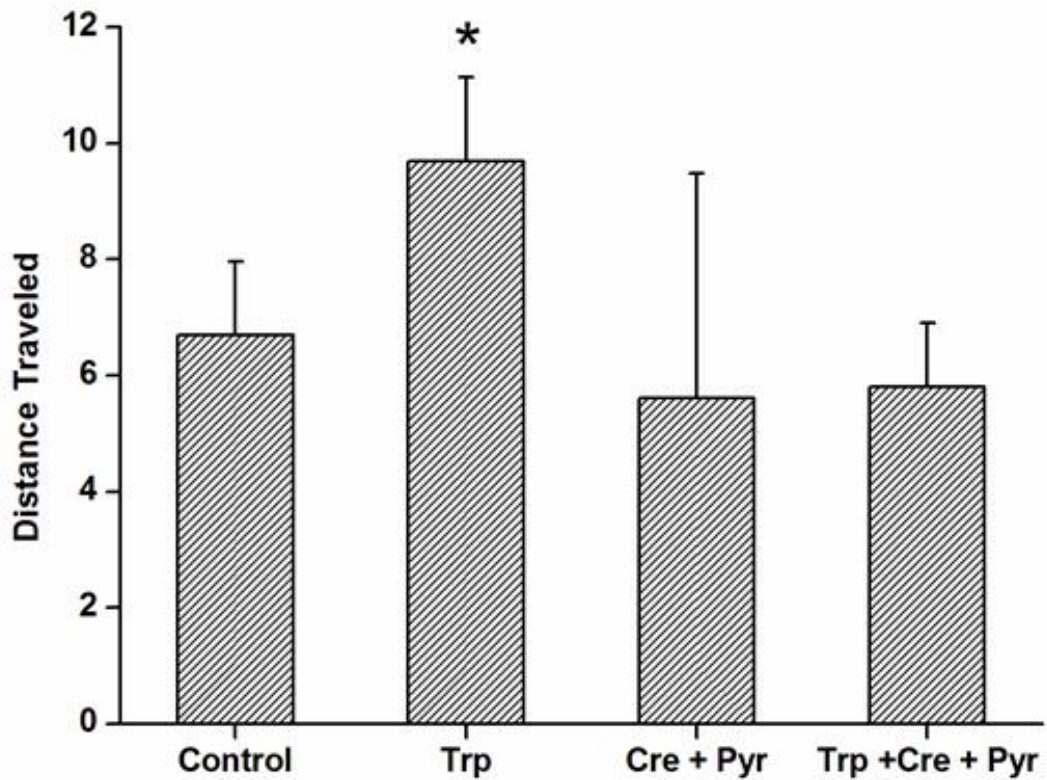


Figure 3. Preventive effect of the association of creatine (Cre) and pyruvate (Pyr) on the increase of the distance traveled (m) caused by tryptophan (trp) administration to rats in the open field task

Data are median and 75 percentil for 8-10 animals in each group. Animals were left to freely explore the arena for 15 min. *P< 0.01 compared to the other groups (Kruskal-Wallis ANOVA followed by the Mann-Whitney test).

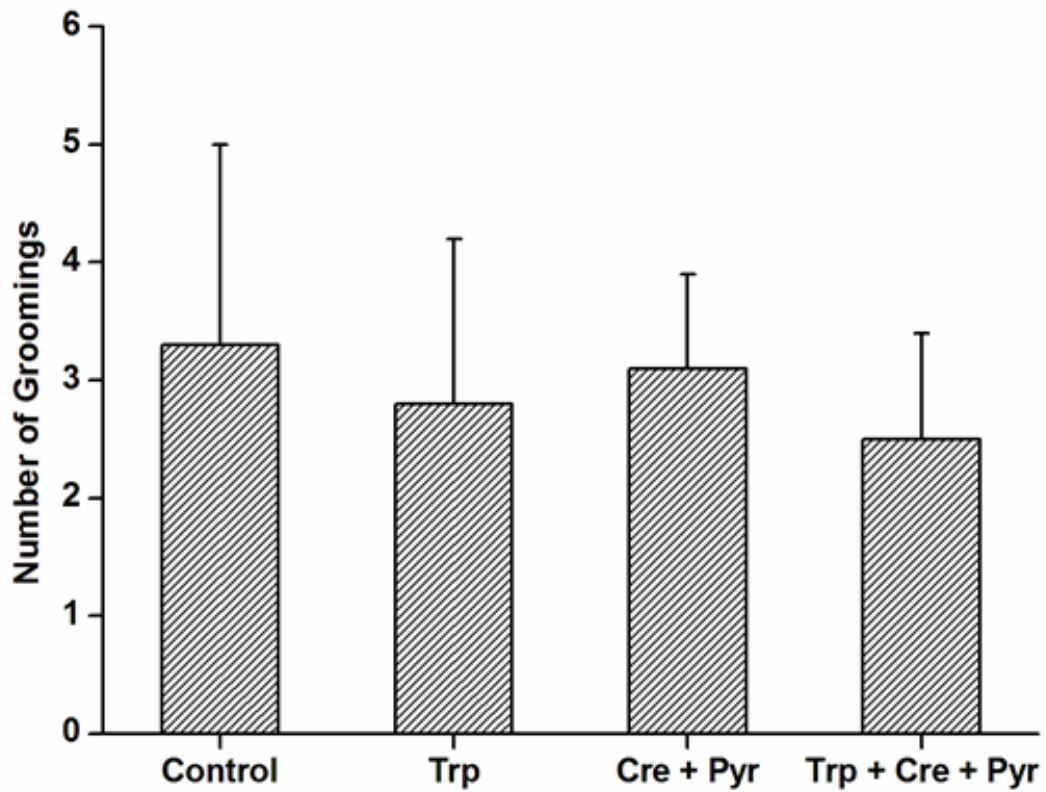


Figure 4. Effect of tryptophan (Trp) and the association of creatine (Cre) and pyruvate (Pyr) administration on the number of grooming performed by rats in the open field task

Data are median and 75 percentil for 8-10 animals in each group. Animals were left to freely explore the arena for 15 min.

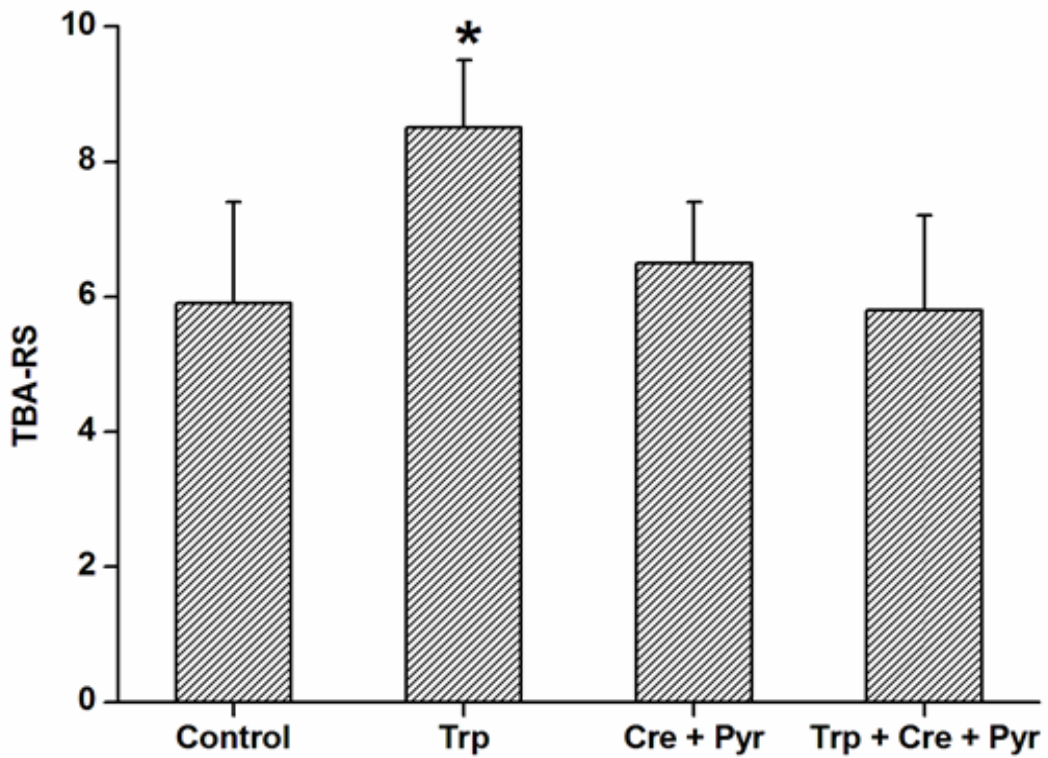


Figure 5. Preventive effect of the association of creatine (Cre) and pyruvate (Pyr) on the increase of lipoperoxidation (TBA-RS) caused by tryptophan (trp) administration in the hippocampus of rats

Data are mean and standard deviation of triplicates for 8-10 animals in each group and are expressed as nmol of TBA-RS per mg of protein. *P < 0.01 compared to the other groups (Two-way ANOVA followed by Tukey test).

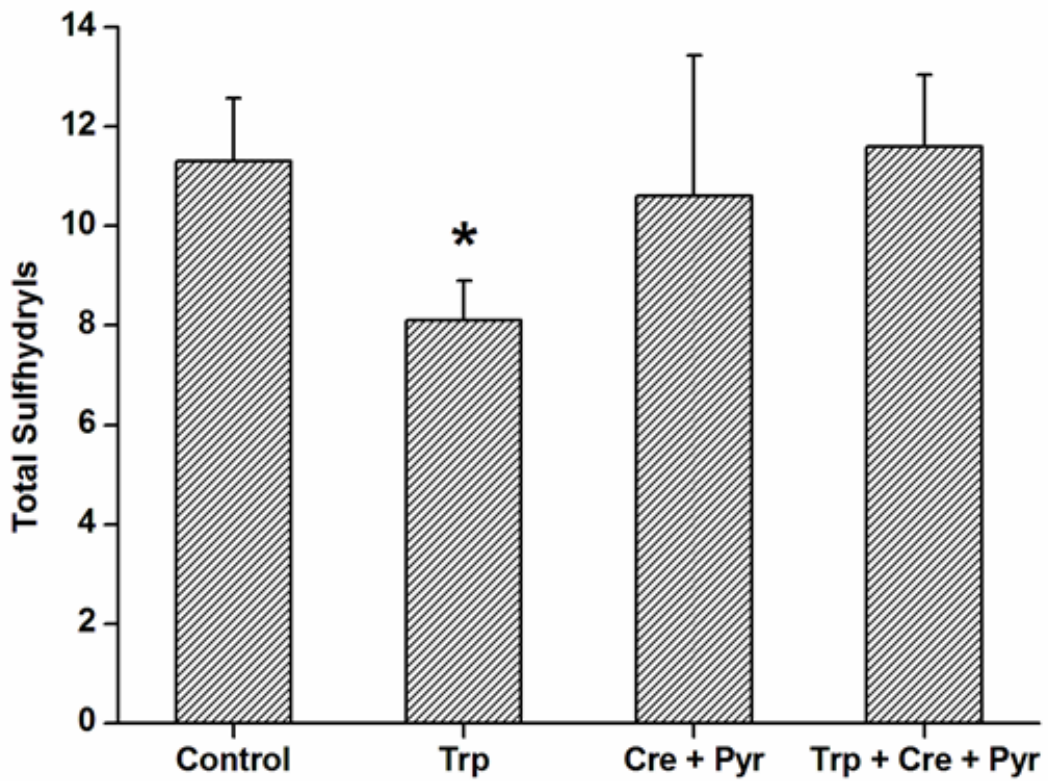


Figure 6. Preventive effect of the association of creatine (Cre) and pyruvate (Pyr) on the decrease of total sulphydryls caused by tryptophan (trp) administration in the hippocampus of rats

Data are mean and standard deviation of triplicates for 8-10 animals in each group and are expressed as nmol of TNB per mg of protein. *P < 0.01 compared to the other groups (Two-way ANOVA followed by Tukey test).

3. DISCUSSÃO

Sabe-se que um grande número de doenças neurológicas está relacionada com anormalidades no metabolismo do Trp, mas esta relação ainda não está completamente elucidada. A via das quinureninas, a maior rota de catabolismo do L-triptofano, leva à produção de 3-HK como um metabólito intermediário (Okuda et al., 1996; Heyes, 1996; Stone, 2001). O aumento nas concentrações de 3-HK, foi detectado em algumas doenças neurodegenerativas, como HD (Pearson and Reynolds, 1992) e PD (Ogawa et al., 1992).

Estudos de diferentes laboratórios têm demonstrado que o maior contribuidor para a patogênese da doença neurodegenerativa pode ser o prejuízo no metabolismo energético celular (Beal, 1992; Beal et al., 1993; Beal, 1995; Hodgkins and Schwarcz, 1998) e estresse oxidativo (Coyle and Puttfarcken, 1993). Nakagami et al. (1996) reportou a produção de ROS por 3-HK. Isso sugere que 3-HK induz a morte de células neuronais, precedida pelo mal funcionamento da mitocôndria, incluindo colapso do potencial de membrana mitocondrial com seletividade por regiões do cérebro e características apoptóticas relevantes na patologia de muitas doenças neurodegenerativas (Eastman and Guilarte, 1989; Okuda et al., 1996; Okuda et al., 1998; Lee et al., 2004).

O dano oxidativo pode ocorrer quando há estresse oxidativo, caracterizado pelo desequilíbrio entre a geração de radicais livres e o sistema de remoção desses. O cérebro pode ser particularmente vulnerável ao aumento de espécies reativas, devido à sua alta taxa metabólica oxidativa e níveis moderados de defesas antioxidantes comparados com outros tecidos (Halliwell et al., 1996; e Halliwell et al., 1999).

Nosso estudo mostrou que a administração de Trp induziu o aumento de TBA-

RS e reduziu o conteúdo de sulfidrilas totais no hipocampo, indicando a indução de estresse oxidativo. Entretanto, pudemos observar que esse aumento de TBA-RS e diminuição de sulfidrilas totais foi totalmente prevenido pela pré-tratamento com Cr mais Pir, dois potentes antioxidantes reforçando a hipótese de estresse oxidativo.

Nossos resultados também mostraram que a administração de Trp causou déficit de aprendizado/memória nos animais em um teste comportamental clássico, o campo aberto. Os animais que receberam Trp uma hora antes do treino apresentaram redução da atividade exploratória (distância viajada, número de rearings e crossings), refletindo assim, a dificuldade em habituar-se ao novo ambiente, enquanto os animais controle e os que receberam Cr + Pir, apresentaram um comportamento normal de habituação. Contudo, novamente pudemos observar que quando a administração de Trp foi precedida pelo tratamento com Cr e Pir os animais submetidos ao campo aberto apresentaram redução no número de crossings e rearings ao decorrer da sessão.

Os resultados obtidos em nosso trabalho, portanto, estão de acordo com resultados de estudos anteriores, que mostram os efeitos tóxicos do Trp e/ou seus metabólitos e dos efeitos antioxidantes diretos e indiretos apresentados por Cr e Pir.

4. CONCLUSÕES

O Trp é um aminoácido essencial que pode ser convertido em diferentes compostos, por diversas vias distintas. inibe a atividade da CK in vivo, no cérebro de ratos e sua administração induz ao estresse oxidativo e que Cr e Pir possuem propriedades antioxidantes diretas e indiretas.

1. Como o aumento da atividade exploratória indica uma diminuição da capacidade de habituação ao ambiente novo, podemos concluir que o Trp interferiu no processo de aprendizado/memória dos animais submetidos ao campo aberto.
2. A administração de Trp gerou um aumento de TBA-RS e diminuição de sulfidrilas totais no hipocampo, demonstrando seu poder oxidante e sua capacidade de gerar estresse oxidativo.
3. O pré-tratamento com Cr + Pir preveniu os efeitos causados pelo Trp no campo aberto, diminuindo a atividade exploratória do animais, sugerindo assim, que a capacidade de aprendizado/memória foi preservada.
4. A análise se TBA-RS e sulfidrilas totais, no hipocampo mostrou que a associação de Cr + Pir preveniu totalmente os efeitos do Trp, evitando assim o estresse oxidativo.

Com o presente trabalho, pudemos confirmar os efeitos tóxicos do Trp e/ou seus metabólitos na geração de estresse oxidativo e os efeitos preventivos da pré administração de duas poderosas substâncias antioxidantes: Cr e Pir.

5. PERSPECTIVAS

Nossos resultados abrem a perspectiva de continuarmos a investigação com os seguintes objetivos:

- Verificar o efeito da administração crônica de triptofano sobre os parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo.
- Verificar se *in vitro*, os efeitos do triptofano, sobre os parâmetros de estresse oxidativo são os mesmos e se são igualmente prevenidos pelo pré-tratamento de creatina e piruvato.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS

- Allegri G, Costa CV, Bertazzo A, Biasiolo M, Ragazzi E (2003). Enzyme activities of tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in various species of animals. *Farmaco* 58: 829-36.
- Baran H, Staniek K, Kepplinger B, Gille L, Stolze K, Nohl H (2001). Kynurenic acid influences the respiratory parameters of rat heart mitochondria. *Pharmacology* 62: 119-23.
- Baran H, Staniek K, Kepplinger B, Stur J, Draxler M, Nohl H (2003). Kynurenines and the respiratory parameters on rat heart mitochondria. *Life Sci.* 72: 1103-15.
- Benson, P.F. and Fenson, R.H. (1985) Genetic biochemical disorders. Oxford, Oxford univ. Press, pp. 252-5.
- Boveris A., Chance B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134:701-16.
- Chiarugi A, Meli E, Moroni F (2001b). Similarities and differences in the neuronal death processes activated by 3OH-kynurenine and quinolinic acid. *J Neurochem* 77: 1310-1318.
- Christen S, Peterhans E, Stocker R (1990). Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: possible implication for inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2506-10.
- Cooper C., Vollaard N., Choueiri T., Wilson M. (2002) Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 30:280-5.
- Dale WE, Dang Y, Brown OR (2000). Tryptophan metabolism through the kynurenine pathway in rat brain and liver slices. *Free Radic Biol Med.* 15: 191-8.
- Del Maestro, R.F. (1980). An approach and to free radicals in medicine and biology.

Acta Physiologica Scandinavica Supplementum. 492:153-167.

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

Eastman C.L., Guilarte T.R. (1989) Cytotoxicity of 3-hydroxykynurenine in a neuronal hybrid cell line *Brain Res* 495:225-231.

Espey MG, Chernyshev ON, Reinhard JJ, Namboodiri MA, Colton CA (1997). Activated human microglia produce the excitotoxin quinolinic acid. *Neuroreport* 8: 431-434.

Ferrante RJ, Kowall NW, Beal MF, Richardson EP Jr, Bird ED, Martin JB (1985). Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science* 230: 561-3.

Ferrante R.J., Andreassen O.A., Jenkins B.G., Dedeoglu A., Kuemmerle S., Kubilus J.K., et al. (2000) Neuroprotective Effects of Creatine in a Transgenic Mouse Model of Huntington's Disease. *J Neurosci* 20:4389-97.

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

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

Genaro G., Schmidek W.R. (2000) Exploratory activity of rats in three different environments. *Ethology* 106:849-59.

Greenhaff P.L., Bodin K., Soderlund K., Hultman E. (1994) Effect oral creatine supplementation on skeletal muscle phosphocreatine resynthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 226:725-30.

- Guillemin GJ, Kerr SJ, Pemberton LA, Smith DG, Smythe GA, Armati PJ, Brew BJ (2001b). IFN-beta1b induces kynurenine pathway metabolism in human macrophages: potential implications for multiple sclerosis treatment. *J Interferon Cytokine Res.* 21: 1097-101.
- Guillemin GJ, Kerr SJ, Smythe GA, Smith DG, Kapoor V, Armati PJ, Croitoru J, Brew BJ (2001a). Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. *J Neurochem* 78: 1–13.
- Harris R.C., Soderlund K., Hultman E. (1992) Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation. *Clin Sci* 83:367-74.
- Heyes MP, Saito K, Markey SP (1992b). Human macrophages convert L-tryptophan into the neurotoxin quinolinic acid. *Biochem J* 283: 633–635.
- Holtzman, N.A. (1978). Rare diseases, common problems: recognition and management. *Pediatrics*.62:1056-60.
- Klivenyi P, Ferrante R.J., Matthews R.T., Bogdanov M.B., Klein A.M., Andreassen O.A., et al. (1999) Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Med* 5:347-50.
- Knapp A. (1960) Familial essential tryptophan metabolism disorder (essential hereditary vitamin B6 deficiency). *Klin Wochenschr* 38:74-80.
- Komrower GM, Wilson V., Clamp JR, Westall RG (1964). Hydroxykynureninuria. A case of abnormal tryptophan metabolism probably due to a deficiency of kynureninase. *Arch dis Child* 39: 250-256.
- Lee DR, Semba R, Kondo H, Goto S, Nakano K (1999). Decrease in the levels of NGF and BDNF in brains of mice fed a tryptophan deficient diet. *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 337–340.

- Lee H.J., Bach J., Chae H., Lee S.H., Joo W.S., Choi S.H., Kim K.Y., Lee W.B., Kim S.S. (2004) Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase attenuates 3-hydroxykynurenine-induced neuronal cell deaths J. Neurochem 88:647-656.
- Levy H.L. (1979) Hartnup disorder. In (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly W.S. e Valle D., eds) *The metabolic bases of Inherited Diseases*, 6th edn., McGraw-Hill, New York, pp 2515-2527.
- Lin M. T., Beal M. F. (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443:787-95.
- Matthews RT, Ferrante RJ, Klivenyi P, Yang L, Klein AM, Mueller G, Kaddurah-Daouk R and Beal MF (1999). Creatine and cyclocreatine attenuate MPTP neurotoxicity. *Exp. Neurol.* 157: 142-149.
- Mecocci P., Fano G., Fulle S., MacGarvey U., Shinobu L., Polidori M.C., et al. (1999) Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids and proteins in human skeletal muscle. *Free Radical Biol Med.* 26:303-8.
- Meneghini, R. (1987). *Ciência Hoje.* (5). 28:57-62.
- Musajo L, Benassi CA (1964). Aspects of Disorders of the Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism in Man. *Adv Clin Chem.* 19: 63-135.
- Ogawa T., Matson W. R., Beal M. F., Myers R. H., Bird E. D., Milbury P. and Saso S. (1992) Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease. *Neurology* 42, 1702–1706.
- Okuda S., Nishiyama N., Saito H., Katsuki H. (1998) 3-hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity J Neurochem 70:299-307.
- Peters JC (1991). Tryptophan nutrition and metabolism: an overview. *Adv Exp Med*

Biol. 294: 345-58.

Price JM, Brown RR, Yess N (1965). Testing the functional capacity of the tryptophan-
niacin pathway in man by analysis of urinary metabolites. *Adv Metab Disord.* 2:
159-225.

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

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia A, McNamara JO, Williams
SM, editors (2001). *Neuroscience*. 2nd ed. Sunderland (MA): [Sinauer Associates,
Inc.](#)

Qin ZH, Gu ZL (2004). Huntingtin processing in pathogenesis of Huntington disease.
Acta Pharmacol Sin 25: 1243-1249

Reynolds GP, Pearson SJ (1989). Increased brain 3-hydroxykynurenine in Huntington's
disease. *Lancet.* 2: 979-980.

Royes L.F.F., Figuera M.R., Furian A.F., Oliveira M.S., Myskiw JdC, Fiorenza N.G., et
al. (2006) Effectiveness of creatine monohydrate on seizures and oxidative
damage induced by methylmalonate. *Pharmacol Biochem Behav* 83:136-44.

Sestili P., Martinelli C., Bravi G., Piccolo G., Curci R., Battistelli M, et al. (2006)
Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured
mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Rad Biol Med* 40:837-49.

Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (eds). (2001). *The Metabolic and
Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th Ed., McGraw-Hill, New York.

Sian J, Youdin MBH, Riederer P, Gerlach M (1999). Neurotransmitters and Disorders of
the Basal Ganglia. in: Siegal GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD
editors. *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular, and Medical Aspects* 6th ed.

Philadelphia: [Lippincott, Williams & Wilkins](#).

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

Smith DG, Guillemin GJ, Pemberton L, Kerr S, Nath A, Smythe GA, Brew BJ (2001). Quinolinic acid is produced by macrophages stimulated by platelet activating factor, Nef and Tat. *J Neurovirol* 7: 56–60.

Southorn, P.A. & Powis, G. (1988). Free radicals in medicine I. Nature and biologic reactins. *Mayo Clinnic Proceedings*. 63:381-389.

Tarnopolsky M. A. and Beal M. F. (2001) Potential for creatine and other therapies targeting cellular energy dysfunction in neurological disorders. *Ann. Neurol.* 49, 571-594.

Widner B, Ledochowski M, Fuchs D (2000b). Sleep disturbances and tryptophan in patients with Alzheimer's disease. *Lancet* 355: 755–756.

Zhang W., Narayanan M., Friedlander R.M. (2003) Additive neuroprotective effects of minocycline with creatine in a mouse model of ALS. *Ann Neurol* 53:267-70.

Wong PW, Forman P, Tabahoff B, Justice P (1976). A defect in tryptophan metabolism. *Pediatr Res.* 10: 725-30.