

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**ESTUDOS SOBRE OS MECANISMOS DAS ALTERAÇÕES DO METABOLISMO
ENERGÉTICO E DAS ATIVIDADES DE ECTO-NUCLEOTIDASES EM ANIMAIS
SUBMETIDOS À HIPERARGININEMIA**

DÉBORA DELWING

ORIENTADORA

Prof^ª. Dr^ª. Angela Terezinha de Souza Wyse

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas –
Bioquímica, ICBS da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito
parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica

Porto Alegre, 2007

***Dedico este trabalho à minha família, pelo
incentivo constante, amor e compreensão.***

"O poder nasce do querer. Sempre que o homem aplicar a veemência e perseverante energia de sua alma a um fim, vencerá os obstáculos, e, se não atingir o alvo fará, pelo menos, coisas admiráveis."

Dale Carnegie

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e amiga, Profa. Dra. Angela T. S. Wyse pela oportunidade, presença constante, paciência, incentivo, compreensão, ensinamentos, exemplo profissional, conselhos e pelo carinho com que orientou este trabalho.

Aos professores do grupo dos Erros Inatos do Metabolismo: Clóvis, Moacir e Dutra, pela convivência e pelos ensinamentos.

Aos bolsistas e colegas alunos de pós-graduação: Daniela, Fábria, Caren, Francieli, Cristiane Matté, Siomara, Andréa Kurek, Cristiane Mattos, Emilene, Alexandra e Emílio, Bárbara, Vanize, Janaina, Thiago, Andréa Cornélio, Juliana, Virginia, Manuela, Ana Elisa e Renan pela amizade, apoio, colaboração na realização deste trabalho e também pela alegria e companheirismo sempre manifestados.

Aos meus pais, Ciro e Dalila, pelo amor, compreensão, carinho, incentivo, por tudo que me ensinaram e por serem sempre o meu porto seguro.

À minha irmã Daniela por estar sempre presente; pelo incentivo, confidências, amizade, companheirismo e vontade de vencer.

Ao meu irmão Fábio pelo apoio constante e carinho; e, sobretudo, por ter sido o intercessor na realização deste sonho.

Ao meu marido Luciano, pela compreensão, incentivo, amor e paciência.

A todos os funcionários e professores deste Departamento pela atenção e auxílio.

Aqueles que de uma forma ou de outra estiveram ao meu lado durante a execução deste trabalho.

Ao CNPq, CAPES, FAPERGS, PROPESQ e UFRGS.

A Deus, pela vida e por ter me mostrado o caminho pelo qual eu deveria seguir.

RESUMO

A hiperargininemia é um erro inato do ciclo da uréia causado pela deficiência na atividade da arginase hepática, a qual catalisa a conversão de arginina (Arg) em uréia e ornitina. Esta doença é caracterizada bioquimicamente pelo acúmulo tecidual de Arg. Retardo mental e outras alterações neurológicas, cujos mecanismos são ainda desconhecidos, são sintomas comuns em pacientes hiperargininêmicos.

Considerando que a disfunção neurológica característica da hiperargininemia é pouco conhecida e que o metabolismo energético está associado com a fisiopatologia de muitas doenças que afetam o sistema nervoso central, o objetivo geral do nosso estudo foi investigar o efeito da administração aguda de Arg sobre alguns parâmetros importantes de metabolismo energético, tais como a captação de glicose, liberação de lactato, produção de CO₂ a partir de glicose, atividade de enzimas da cadeia respiratória (CR) e atividades da creatinaquinase (CK) e Na⁺,K⁺-ATPase em cérebro de ratos. Também verificamos o efeito da Arg sobre a hidrólise de nucleotídeos em sinaptossomas obtidos de hipocampo de ratos e em soro de ratos, bem como o efeito da administração intracerebroventricular de Arg sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo. Em adição, também investigamos a influência dos antioxidantes, α -tocoferol e ácido ascórbico e do N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), um potente inibidor da enzima óxido nítrico sintase, sobre os efeitos causados pela Arg.

Os resultados do presente trabalho mostraram que a Arg reduziu o metabolismo energético cerebral, uma vez que houve redução na captação de glicose, aumento da liberação de lactato, diminuição na atividade do complexo II e da succinato

desidrogenase (SDH) da CR, redução na produção de CO₂ a partir de glicose e redução nas atividades das enzimas CK e Na⁺,K⁺-ATPase, provavelmente através da geração de óxido nítrico e/ou peroxinitrito e/ou outros radicais livres, visto que antioxidantes importantes como o α -tocoferol e ácido ascórbico e o L-NAME preveniram esses efeitos. Verificamos também que a Arg induziu o estresse oxidativo, visto que a infusão intracerebroventricular de Arg acarretou em aumento da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e diminuição da capacidade antioxidante total não-enzimática (TRAP), corroborando assim, com nossos resultados prévios. Em adição, também mostramos que a administração aguda de Arg alterou a hidrólise de nucleotídeos adenínicos em sinaptossomas de hipocampo de ratos, bem como em soro de ratos. Esses resultados em conjunto, poderão auxiliar no entendimento dos sintomas e distúrbios neurológicos observados em pacientes hiperargininêmicos. Além disso, se confirmados em humanos, esses resultados podem sugerir que a suplementação com antioxidantes possa ser utilizada como uma estratégia no tratamento da hiperargininemia.

ABSTRACT

Hyperargininemia is an inherited metabolic disease caused by severe deficiency of liver arginase activity, an enzyme of the urea cycle which catalyses the conversion of arginine (Arg) to urea and ornithine. This disease is biochemically characterized by tissue accumulation of Arg. Mental retardation and other neurological features, whose mechanisms are still obscure, are common symptoms in hyperargininemic patients.

Considering that the neurological dysfunction characteristic of hyperargininemia is not yet well established and that energy metabolism is associated with the pathophysiology of several diseases that affect the central nervous system, the general objective of the present study was to investigate the effect of acute Arg administration on some important parameters of energy metabolism, such as glucose uptake, lactate release, CO₂ production from glucose, activities of enzymes of the respiratory chain and activities of creatine kinase (CK) and Na⁺,K⁺-ATPase in rat brain. We also tested the effect of Arg on the hydrolysis of nucleotides in synaptosomes from hippocampus of rats and in serum of rats, as well as the effect of intracerebroventricular injection of Arg on some parameters of oxidative stress. In addition, we also evaluated the influence of antioxidants, namely α-tocopherol plus ascorbic acid and N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a potent nitric oxide synthase inhibitor, on the effects elicited by Arg.

The results of the present study showed that Arg impairs brain energy metabolism, since decreased glucose uptake, increased lactate release, diminished the activities of complex II and succinate dehydrogenase (SDH) of the respiratory

chain, inhibited CO₂ production from glucose and decreased the activities of the enzymes CK and Na⁺,K⁺-ATPase, probably through the generation of nitric oxide and /or its derivatives peroxynitrite and/or other free radicals, since important antioxidants such as α -tocopherol plus ascorbic acid and the L-NAME prevented these effects. We also verified that Arg induced oxidative stress, since intracerebroventricular infusion of Arg increased the production of thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) and reduced total radical-trapping parameter (TRAP). These results are in agreement with our previous findings. In addition, we also showed that acute Arg administration altered adenine nucleotide hydrolysis in synaptosomes from hippocampus of rats, as well as in serum of rats. This group's results may be helpful in the understanding of the symptoms and brain dysfunction showed by hyperargininemic patients. Besides, if these findings also occur in humans, we can suggest that the supplementation with antioxidants should be used as a strategy to the treatment of hyperargininemia.

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO	01
1.1 Erros Inatos do Metabolismo	01
1.2 Ciclo da uréia	02
1.2.1 Argininemia ou hiperargininemia	05
1.3 Modelo animal de hiperargininemia	10
1.4 Radicais livres e estresse oxidativo	11
1.5 Óxido nítrico	12
1.6 Metabolismo energético	14
1.6.1 Glicólise e ciclo do ácido cítrico.....	15
1.6.2 Cadeia Respiratória Mitocondrial.....	17
1.7 Na⁺, K⁺-ATPase	19
1.8 Creatinaquinase	22
1.9 Ectonucleotidases	24
II OBJETIVOS	27
Objetivo Geral.....	27
Objetivos específicos	
Capítulo I	28
Capítulo II.....	29
Capítulo III	30
Capítulo IV.....	31
Capítulo V	32

Capítulo VI.....	33
III RESULTADOS E METODOLOGIAS.....	34
Capítulo I	34
Capítulo II.....	48
Capítulo III	60
Capítulo IV.....	72
Capítulo V	104
Capítulo VI.....	113
IV DISCUSSÃO.....	120
V CONCLUSÕES.....	138
VI PERSPECTIVAS.....	143
VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	144

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação esquemática do ciclo da uréia (Berg et al., 2004).....	3
FIGURA 2. Conversão de arginina em uréia e ornitina.....	5
FIGURA 3. Vias catabólicas para arginina em pacientes hiperargininêmicos (Adaptado de Marescau et al., 1990).....	7
FIGURA 4. Reação entre óxido nítrico e ânion superóxido, formando ânion peroxinitrito, ácido peroxinítrico e nitrato (Adaptado de Dawson e Dawson, 1996).....	13
FIGURA 5. Ciclo do ácido cítrico (Adaptado de Berg et al., 2004).....	16
FIGURA 6. Fluxo de elétrons através dos quatro complexos da cadeia respiratória (Adaptado de Smith et al., 2005).....	19
FIGURA 7. Estrutura da Na ⁺ , K ⁺ -ATPase (Adaptado de Voet et al., 2006).....	21
FIGURA 8. Reação de transfosforilação catalizada pela enzima creatinaquinase.....	22

LISTA DE ABREVEATURAS

AcetilCoA: acetil coenzima A
ADP: adenosina 5'-difosfato
AL: arginossuccinato liase
AMP: adenosina 5'-monofosfato
Arg: arginina
ArgA: ácido arginínico
AS: arginossuccinato sintase
ATP: adenosina 5'- trifosfato
CK: creatinaquinase
CoQ: coenzima Q
COX: citocromo c oxidase
CO₂: gás carbônico
CP: carbamil fosfato
CPS: carbamil fosfato sintase
CR: cadeia respiratória
Cr: creatina
EI: erros inatos
EIM: erros inatos do metabolismo
FAD: flavina adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
FADH₂ : flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
FMN: flavina mononucleotídeo
GAA: ácido guanidinoacético
GBA: ácido γ -guanidinobutírico
GTP: guanosina trifosfato
GVA: ácidos α -ceto- γ -guanidinovalérico
L-NAME: N^o-nitro-L-arginine methyl ester
NAArg: N- α -acetilarginina
NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)

NADH. H⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

ONOO⁻: ânion peroxinitrito

OTC: ornitina transcarbamilase

FO: fosforilação oxidativa

O₂ : oxigênio molecular

O₂⁻ : ânion superóxido

PCr: fosfocreatina

PPi: pirofosfato inorgânico

SDH: succinato desidrogenase

SNC: sistema nervoso central

TBA-RS : substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TRAP: capacidade antioxidante total não-enzimática

I. INTRODUÇÃO

1.1 Erros inatos do metabolismo

Em 1908, o inglês Archibald Garrod introduziu na literatura médica o termo erros inatos do metabolismo (EIM), iniciando seus estudos em indivíduos afetados com alcaptonúria, albinismo, pentosúria e cistinúria. Garrod sugeriu um modelo de herança autossômica recessiva para essas doenças, pois elas geralmente ocorriam em irmãos e filhos de pais consangüíneos (Scriver et al., 2001).

De acordo com Bickel (1987), EIM são alterações genéticas que se manifestam pela síntese de uma proteína anômala, geralmente uma enzima, ou por uma diminuição ou mesmo ausência de sua síntese. Estas alterações resultam em deficiência da atividade da enzima envolvida, ocasionando bloqueio de rotas metabólicas. Como consequência, pode ocorrer tanto o acúmulo de metabólitos tóxicos como a falta de produtos essenciais, ambos com doença subsequente.

Foram descritos até o momento mais de 500 EIM (Scriver et al., 2001), a maioria deles envolvendo processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Benson e Fensom, 1985).

A classificação mais utilizada para os EIM é realizada de acordo com a área do metabolismo afetada (Scriver et al., 2001) e subdivide-se em: EIM de aminoácidos, ácidos orgânicos, glicídios, lipídios, glicosaminoglicanos, glicoproteínas, purinas e pirimidinas, enzimas eritrocitárias, lipoproteínas, hormônios e proteínas plasmáticas.

Os EIM mais comuns são os EIM de aminoácidos. Citam-se como exemplos a fenilcetonúria, a homocistinúria e a hiperargininemia, os quais apresentam acúmulo tecidual de fenilalanina, homocisteína e arginina (Arg), respectivamente. Este trabalho

enfoca um EIM de aminoácidos denominado hiperargininemia, o qual corresponde a um erro inato (EI) do ciclo da uréia.

1.2 Ciclo da uréia

As vias de degradação dos aminoácidos são muito similares na maioria dos organismos. Os esqueletos carbônicos dos aminoácidos, em geral, seguem para o ciclo do ácido cítrico, para a gliconeogênese ou para a síntese de corpos cetônicos (Berg et al., 2004^a; Lehninger et al., 2007). Já o grupamento amino, liberado na forma de amônia, é em parte consumido na biossíntese de compostos nitrogenados e o excesso é convertido em uréia pelo ciclo da uréia (Berg et al., 2004a). Essa é levada através da circulação sangüínea para os rins onde é facilmente excretada através da urina (Lehninger et al., 2007).

Em 1932, Hans Krebs e Kurt Henseleit elucidaram uma série de reações, as quais compunham o ciclo da uréia. O ciclo da uréia foi a primeira via metabólica cíclica a ser caracterizada (Berg et al., 2004a).

O ciclo da uréia consiste de cinco reações enzimáticas. As etapas do ciclo são descritas a seguir. A carbamil fosfato sintase (CPS), uma enzima de matriz mitocondrial, catalisa a biossíntese de carbamil fosfato (CP), a partir da condensação e ativação de amônio e bicarbonato e subsequente hidrólise de duas moléculas de adenosina 5'-trifosfato (ATP). N-acetilglutamato é um cofator alostérico da CPS e um importante regulador da ureagênese. A ornitina transcarbamilase (OTC), também uma enzima de matriz mitocondrial, catalisa a biossíntese de citrulina a partir de ornitina e CP. A citrulina é transportada para o citosol, onde é condensada com aspartato via

arginossuccinato sintase (AS) para formar arginossuccinato, reação impelida pela clivagem de ATP a AMP e pirofosfato inorgânico (PPi) e subsequente hidrólise do PPi. O arginossuccinato é clivado em Arg e fumarato pela arginossuccinato liase (AL). Por fim, a Arg é hidrolisada pela arginase em uréia e ornitina, que, por sua vez, é transportada para o interior da mitocôndria via sistema de transporte específico, para novamente ser transcarbamilada a citrulina (Brusilow e Horwich, 2001; Berg et al., 2004a; Voet e Voet, 2006) e a uréia é excretada na urina (Fig. 1).

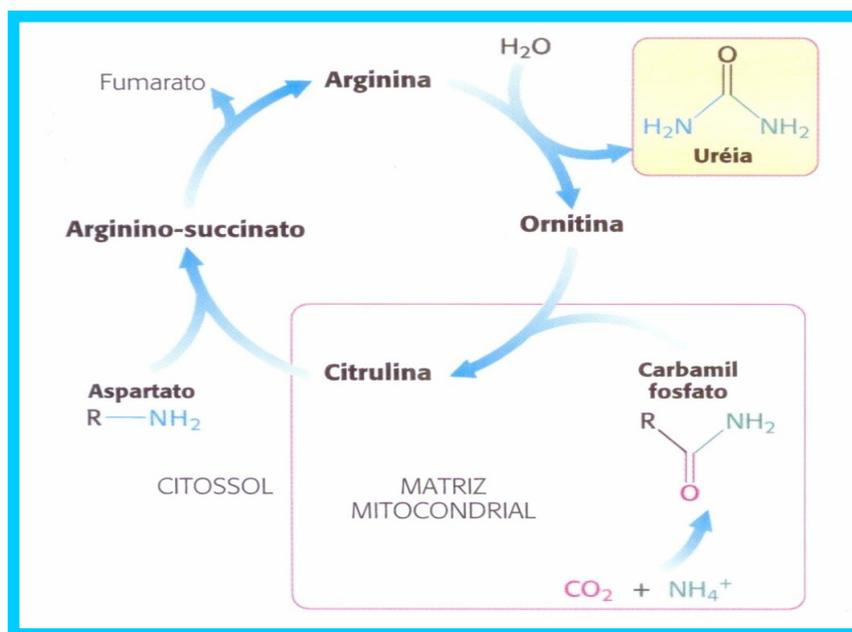


Figura 1. Representação esquemática do ciclo da uréia (Berg et al., 2004).

As doenças conhecidas como EI do ciclo da uréia eram consideradas, há algumas décadas atrás, doenças raras e que ocorriam principalmente em neonatos. Contudo, após vinte anos de pesquisas realizadas em centros de referência, verificou-

se que estas doenças também podem ocorrer em idades mais avançadas e de forma mais comum do que previamente se imaginava (Brusilow e Horwich, 2001).

Os EI do ciclo da uréia estão geralmente associados à deficiência de uma enzima particular do ciclo. Foram descritas cinco doenças ocasionadas pela deficiência na biossíntese das enzimas do ciclo da uréia (deficiência de CPS, OTC, AS, AL e arginase), sendo a prevalência total estimada em 1 caso para cada 30.000 nascidos vivos (Msall et al., 1984).

Os EI do ciclo da uréia são caracterizados por sinais e sintomas tais como: hiperamoninemia, encefalopatia e alcalose respiratória. Acredita-se que esses sintomas são induzidos pelo acúmulo de precursores de uréia, principalmente amônia e glutamina. Quatro destas cinco doenças – deficiência de CPS, OTC, AS e AL – apresentam manifestações clínicas praticamente idênticas e são caracterizadas por sinais e sintomas que parecem ser induzidos pelo acúmulo de amônia (Brusilow e Horwich, 2001).

A deficiência de arginase é caracterizada por um quadro clínico que consiste de espasticidade progressiva, retardo mental e hiperamonemia sintomática, a qual pode ser tratada. A hiperamonemia decorrente da deficiência de arginase é menos comum e severa do que a hiperamonemia presente na deficiência das demais enzimas do ciclo da uréia (Brusilow e Horwich, 2001).

1.2.1 Argininemia ou Hiperargininemia

Hiperargininemia é um EI do ciclo da uréia causado pela deficiência na atividade da arginase hepática, a qual catalisa a conversão de Arg em uréia e ornitina (Fig. 2). A herança é autossômica recessiva (Snyderman et al., 1977).

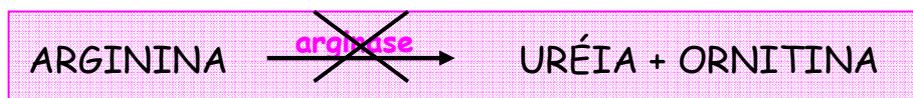


Figura 2. Conversão de arginina em uréia e ornitina.

A principal via de formação e degradação da Arg é o ciclo da uréia. Na hiperargininemia, ocorre deficiência na atividade da arginase, o que compromete a metabolização e eliminação do nitrogênio proveniente da degradação protéica.

A arginase está presente em altas concentrações no fígado, mas encontra-se também em outros tecidos. O fígado é o único órgão que contém todas as enzimas do ciclo da uréia e caracteriza-se por ser o órgão em que ocorre a ureagênese (Jenkinson et al., 1996; Brusilow e Horwich, 2001).

Em 1983, foi demonstrada a existência de duas isoenzimas da arginase: a arginase A I, que é citosólica, presente no fígado e também em eritrócitos, e que possui atividade catabólica e ureagênica; e a arginase A II, que é substancialmente mitocondrial, presente em tecidos extra-hepáticos, como o rim, trato gastrointestinal, cérebro e próstata, e que é considerada uma enzima biossintética, a qual tem, como principal produto, a ornitina (Jenkinson et al., 1996; Gotoh et al., 1997).

A principal conseqüência da deficiência de arginase é a elevação de Arg no plasma e no fluído cérebro-espinhal, o que se comprova em todos os pacientes com hiperargininemia. A concentração plasmática de Arg pode atingir 1,5 mM e há dados mostrando que no fluído cérebro-espinhal, os valores podem ser até 10 vezes superiores ao valor normal (Snyderman et al., 1977).

A Arg acumulada na hiperargininemia poderá ser metabolizada por uma série de reações enzimáticas secundárias, formando uma quantidade significativa de seus metabólitos, os compostos guanidínicos. Dessa forma, a Arg pode ser catabolizada por transaminação a ácido α -ceto- γ -guanidinovalérico (GVA); por descarboxilação oxidativa a GVA e ácido γ -guanidinobutírico (GBA); por redução a GVA e por ação de uma desidrogenase à ácido arginínico (ArgA) (Marescau et al., 1982). Como alternativa, a transamidinação da Arg pode formar ácido guanidinoacético (GAA) (Dubnoff e Borsook, 1941) e GBA (Pisano e Underfriend, 1963) e sua acetilação resultar em N- α -acetilarginina (NAArg). A via metabólica secundária mais favorecida é a de formação de GVA por transaminação. A atividade de hidrogenação de GVA a ArgA é também bastante pronunciada. Já o aumento na atividade de transamidinação envolvida na biossíntese de GAA, GBA e ácido β -guanidinopropiônico (GPA) é bem menos evidente (Natelson e Sherwin, 1979) (Fig. 3).

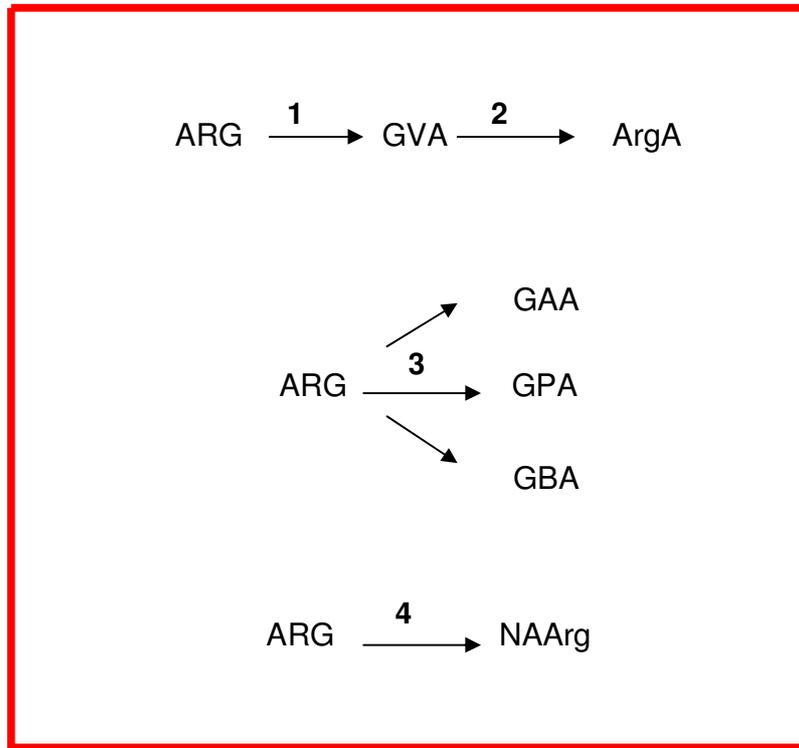


Figura 3. Vias catabólicas para arginina em pacientes hiperargininêmicos. 1- Transaminação; 2- Hidrogenação; 3- Transamidinação; 4- Acetilação (Adaptado de Marescau et al., 1990).

A Arg também é o substrato para a síntese de óxido nítrico (NO). Esse é gerado em todas as células do sistema nervoso central (SNC) por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual, na presença de oxigênio molecular (O₂), tetraidrobiopterina, flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN), catalisa a conversão de Arg em NO e citrulina (Lincoln et al., 1997; Lohse et al., 1998; Law et al., 2001). A Arg parece ser o único substrato fisiológico para a síntese de NO em células eucarióticas. Por outro lado, análogos da Arg são inibidores potentes da NOS (Grant et al., 1998).

Pacientes hiperargininêmicos apresentam uma síndrome neurológica que consiste de um grau variado de retardo mental e psicomotor, epilepsia, severa

espasticidade (com os membros inferiores afetados mais severamente que os membros superiores), hiperatividade e perda progressiva da capacidade motora e mental (Snyderman et al., 1977; Cederbaum et al., 1979; Marescau et al., 1992; De Deyn et al., 1997). Os pacientes podem apresentar episódios intermitentes de vômito, irritabilidade, letargia e coma. Ressalta-se que esses sintomas poderão também ser observados em outros EI do ciclo da uréia (Colombo, 1992). Porém, um sinal bastante peculiar desta doença é a espasticidade progressiva, que não é observada nas demais doenças do ciclo da uréia, sendo, portanto, característica da hiperargininemia (Marescau et al., 1990).

A patogênese do quadro clínico característico apresentado por pacientes hiperargininêmicos é ainda desconhecida (Cederbaum et al., 1977).

A hiperamonemia parece ser a causa do dano causado ao SNC de pacientes com enzimopatias do ciclo da uréia. No entanto, em pacientes hiperargininêmicos, a hiperamonemia observada é intermitente, ao contrário das demais enzimopatias do ciclo da uréia. Portanto, o acúmulo de amônia, não é o único fator responsável pelo dano cerebral observado nesses pacientes. Supõe-se que outros fatores devam contribuir com os sintomas neurológicos característicos de pacientes hiperargininêmicos (Mizutani et al., 1987). Nesse contexto, Marescau e colaboradores (1990), propuseram a hipótese de que a Arg, ao invés da amônia, seria neurotóxica nestas condições. Este fato levou diversos pesquisadores a investigarem o papel da Arg e de seus metabólitos, os compostos guanidínicos, na patogênese dessa doença (Marescau et al., 1990, 1992; De Deyn et al., 1997; Silva et al., 1999).

Também foi sugerido que o excesso de Arg presente na hiperargininemia poderia servir de substrato para a síntese de NO, e que o excesso de produção desse poderia ter um papel na fisiopatologia dessa doença (Mori et al., 1998). Entretanto, o(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(is) esse composto e os compostos guanidínicos atuariam no SNC e o quão responsáveis eles seriam pelo dano neurológico presente na hiperargininemia ainda permanecem desconhecidos.

Em relação ao diagnóstico, primeiramente, a hiperargininemia pode ser bioquimicamente diagnosticada pela dosagem dos altos níveis de Arg existentes nos fluídos biológicos dos pacientes (Cederbaum et al., 1977). Pode-se também, utilizar como parâmetro bioquímico, a dosagem dos compostos guanidínicos, os quais são catabólitos da Arg, na urina, plasma e líquido. No entanto, a confirmação do diagnóstico, deve ser obtida através da determinação da atividade da arginase em eritrócitos (Marescau et al., 1992).

Após o diagnóstico, inicia-se o tratamento da hiperargininemia. A restrição protéica foi a primeira medida adotada por pacientes hiperargininêmicos, uma vez que redução da ingestão de nitrogênio reduz o seu fluxo através do ciclo da uréia, diminuindo assim, a biossíntese de Arg (Brusilow e Horwich, 2001).

Os primeiros trabalhos publicados, que descreviam apenas o uso de terapia dietética em pacientes com deficiência de arginase, sugeriam que uma aplicação rigorosa desse tratamento poderia reduzir os níveis plasmáticos de Arg para normais ou próximos ao normal, além de diminuir os níveis anormais de aminoácidos no líquido cérebro-espinhal (Snyderman et al., 1979; Cederbaum et al., 1982; De Deyn et al., 1997). No entanto, estudos mais recentes demonstraram que somente o uso de

restrição protéica não é suficiente para normalizar a hiperargininemia (Marescau et al., 1990; Iyer et al., 1998). Esses estudos sugerem que uma combinação de terapia de restrição protéica juntamente com um suplemento de aminoácidos essenciais com ou sem a administração de benzoato de sódio parece ser eficaz em diminuir os níveis de Arg nos fluídos biológicos (Marescau et al., 1990).

No tratamento da hiperargininemia, pode-se utilizar como estratégia a estimulação de rotas alternativas para excreção de amônia. A administração de benzoato de sódio e/ou ácido fenilacético é efetiva em aumentar a excreção de metabólitos nitrogenados não uréicos em pacientes com EI do ciclo da uréia. A administração oral de benzoato de sódio e ácido fenilacético reduz a amônia plasmática por aumentar a excreção de ácido hipúrico e fenil acetil glutamina, respectivamente (Batshaw et al., 1981; Mizutani et al., 1983; Brusilow e Horwich, 2001; Berg et al., 2004a).

Contudo, apesar do sucesso obtido no manejo de alguns pacientes, não há tratamento definitivo para a hiperargininemia, uma vez que todas as medidas terapêuticas encontradas até o momento são temporárias e devem ser mantidas por toda a vida do indivíduo.

1.3 Modelo animal de hiperargininemia

O modelo animal de hiperargininemia utilizado nesse trabalho foi o mesmo empregado em outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa e baseia-se no modelo experimental desenvolvido por Buchmann e colaboradores (1996). O modelo tem como objetivo reproduzir, em ratos, níveis de Arg semelhantes aos encontrados em

pacientes hiperargininêmicos. A dose de Arg administrada aos ratos é de 0,8 g/Kg de peso corporal, dose em que Buchmann e colaboradores (1996) encontraram níveis de Arg plasmáticos e concentrações cerebrais de aproximadamente 1,3 mM e 0,3 nmol/Kg, respectivamente. Esses dados foram confirmados em nosso grupo de pesquisa.

1.4 Radicais livres e estresse oxidativo

Um radical livre é definido como qualquer espécie capaz de uma existência independente, por mais breve que seja e que contenha um ou mais elétrons não pareados (Halliwell e Gutteridge, 1984). Os principais exemplos de radicais livres de oxigênio são os radicais superóxido, hidroxil, peroxil, alcoxil e hidroperoxil; e como exemplos de radicais livres de nitrogênio citam-se o NO e o dióxido de nitrogênio (Evans e Halliwell, 2001). As espécies reativas de oxigênio são formadas em grande quantidade pela respiração celular, na mitocôndria, principalmente nos complexos I e III da cadeia respiratória (CR), onde ocorre redução incompleta (2-5%) do O₂ (Lenaz, 2001). Depois de formados, estes compostos produzem uma reação de oxidação em cadeia resultando na destruição, modificação ou inativação de inúmeras moléculas. As espécies reativas de oxigênio podem atuar sobre diversos alvos celulares, entre estes estão os lipídios, as proteínas e o DNA (Halliwell e Whiteman, 2004).

O estresse oxidativo é conceituado como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e defesas antioxidantes (Halliwell e Whiteman, 2004). As defesas antioxidantes podem ser divididas em enzimáticas e não-enzimáticas. Entre as enzimas antioxidantes, as principais são superóxido dismutase, catalase, glutaciona

peroxidase e glutathione redutase (Halliwell, 2001; Salvador e Henriques, 2004). Quanto às defesas antioxidantes não-enzimáticas, as principais são as vitaminas, como as vitaminas A, C, E, riboflavina e tiamina, os polifenóis e os compostos de baixo peso molecular, que incluem bilirrubina, α -cetoácidos, melatonina, urato, ácido lipóico, estrógenos e glutathione (Salvador e Henriques, 2004)

O estresse oxidativo é um importante processo que vem sendo relatado na patogênese de algumas condições que afetam o SNC, tais como epilepsia, esclerose múltipla, demência e doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (Reznick e Packer, 1993; Halliwell, 2001; Salvador e Henriques, 2004). Esse fato torna-se facilmente compreensível, visto que o SNC é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo, em face ao alto consumo de O_2 ; ao alto conteúdo lipídico, principalmente de ácidos graxos poliinsaturados; aos altos níveis de ferro, os quais favorecem a lipoperoxidação; e à baixa defesa antioxidante (Butterfield e Stadtman, 1997; Halliwell, 2006).

1.5 Óxido nítrico

O NO é sintetizado endogenamente pela ação da enzima NOS em tecidos especializados tendo como precursora a L-Arg (Moncada e Higgs, 1993; Law et al., 2001). Nesse contexto, especula-se que os altos níveis de Arg, encontrados em pacientes hiperargininêmicos, possam resultar em aumento dos níveis cerebrais de NO. Essa suposição foi apoiada pelos achados de Buchmann e colaboradores (1996), onde se verificou aumento nas concentrações de citrulina no cérebro de ratos após a administração aguda de Arg.

O NO desempenha importante papel fisiológico no SNC em condições normais, como, por exemplo, liberação de neurotransmissores, expressão gênica, percepção da dor, plasticidade sináptica e aprendizado (Dawson e Dawson, 1996; Lincoln et al., 1997; Prast e Philippu, 2001). No entanto, quando há formação excessiva, o NO torna-se um importante mediador de neurotoxicidade (Dawson e Dawson, 1996).

O NO é um radical livre e em muitos sistemas biológicos tem meia vida curta, devido a sua reatividade com outros constituintes intracelulares, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Beckman et al., 1993; McCord, 2000). A reação entre o NO e $O_2^{\cdot-}$ resulta na formação do ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), o qual é citotóxico (Lipton et al., 1993). Essa reação é extremamente favorável, pois o NO pode efetivamente competir com a enzima superóxido dismutase pelo $O_2^{\cdot-}$ (Beckman et al., 1993). Em meio ácido, o $ONOO^-$ é transformado em ácido peroxinítrico, o qual leva à formação espontânea de radical hidroxila. Os nitratos são os produtos finais dessas reações (Fig. 4) (Bergendi et al., 1999).

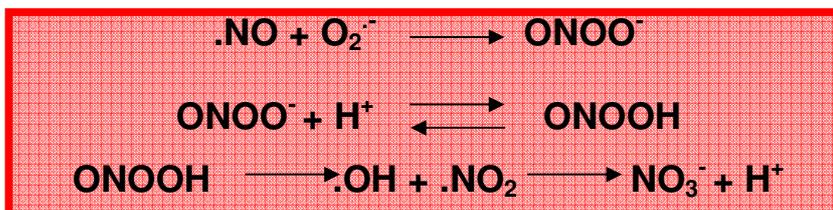


Figura 4. Reação entre óxido nítrico e ânion superóxido, formando ânion peroxinitrito, ácido peroxinítrico e nitrato (Adaptado de Dawson e Dawson, 1996).

Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que a administração aguda de Arg aumenta a lipoperoxidação (quimiluminescência), diminui a capacidade antioxidante total não-enzimática (TRAP) e reduz a atividade da enzima catalase em cérebro de ratos e que a administração de N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), um inibidor competitivo da NOS, previne esses efeitos (Wyse et al., 2001; Delwing et al., 2002). Esses resultados sugerem que a administração de Arg induz o estresse oxidativo como consequência do aumento na formação de NO e/ou ONOO⁻.

1.6 Metabolismo energético

A glicólise e a fosforilação oxidativa (FO) são particularmente importantes no cérebro para a produção de energia, uma vez que a glicose é o principal composto energético utilizado pelo SNC e, no cérebro, a FO fornece mais de 95% do ATP sintetizado (Siesjo, 1978). Durante o jejum prolongado os corpos cetônicos substituem parcialmente a glicose como substrato energético para o cérebro (Nelson e Cox, 2000; Berg et al., 2004b). O transporte da glicose através da barreira hemato-encefálica, bem como através das membranas neuronais e das células gliais é muito rápido. Sendo assim, o metabolismo cerebral da glicose é regulado principalmente por sua fosforilação do que por seu transporte (Lund-Andersen, 1979). A reserva energética cerebral (glicogênio) é extremamente pequena em relação à elevada atividade metabólica desse órgão, de modo que a função normal do SNC requer o suprimento contínuo de glicose a partir da circulação (Erecinska e Silver, 1994). O glicogênio está localizado principalmente, mas não exclusivamente, nos astrócitos (Cataldo e

Broadwell, 1986). No cérebro mais de 95% da glicose é convertida em CO_2 e água (H_2O) enquanto uma pequena fração é convertida em lactato ou segue outras rotas metabólicas (Hawkins et al, 1974; Siesjo, 1978).

Tendo em vista que a FO é responsável pela quase totalidade do ATP produzido no SNC, a regulação da respiração mitocondrial é central para o metabolismo e funções cerebrais.

1.6.1 Glicólise e ciclo do ácido cítrico

A degradação da glicose para produção de energia ocorre em todos os seres vivos, desde a mais antiga e simples bactéria até os complexos organismos multicelulares. A glicólise, também conhecida como via de Ebden-Meyerhof, é a rota metabólica pela qual a glicose é convertida, via frutose-1,6-bifosfato, a piruvato, com a geração de 2 moles de ATP/mol de glicose. Essa seqüência de 10 reações enzimáticas tem papel fundamental no metabolismo energético por fornecer parte da energia utilizada pela maioria dos organismos. Em condições anaeróbicas, o piruvato é prontamente convertido a um produto final reduzido, o lactato. As enzimas da via glicolítica estão localizadas no citosol (Berg et al., 2004b; Voet e Voet, 2006). Entretanto, sob condições aeróbicas, a etapa seguinte na produção de energia a partir de glicose é a descarboxilação oxidativa do piruvato para formar acetil coenzima A (acetil CoA). A acetil CoA é conseqüentemente completamente oxidada a CO_2 pelo ciclo do ácido cítrico, através de uma série de reações também conhecida como ciclo dos ácidos tricarboxílicos ou ciclo de Krebs. Em contraste à glicólise, as reações do ciclo do ácido cítrico ocorrem no interior da mitocôndria. O ciclo do ácido cítrico opera

somente em condições aeróbicas, porque requer um suprimento de NAD^+ e FAD . Em cada volta do ciclo, são formadas três moléculas de NADH , H^+ , uma molécula de FADH_2 , duas de CO_2 e uma de GTP (Fig. 5). Os carreadores, NAD^+ e FAD , são regenerados quando o NADH , H^+ e o FADH_2 transferem seus elétrons ao O_2 através da cadeia de transporte de elétrons, com a concomitante produção de ATP (Nelson e Cox, 2000; Berg et al., 2004c). Cabe salientar, que a acetil CoA, também é obtida pela oxidação de outras biomoléculas, como aminoácidos e ácidos graxos (Berg et al., 2004b).

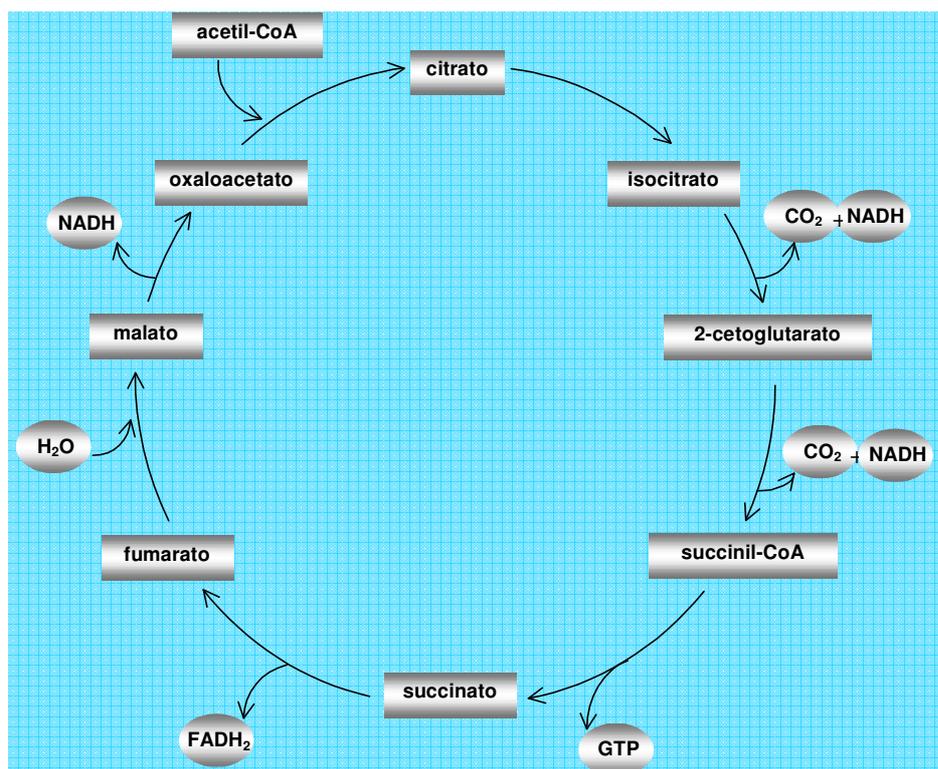


Figura 5. Ciclo do ácido cítrico (Adaptado de Berg et al., 2004).

1.6.2 Cadeia Respiratória Mitocondrial

A energia necessária para produção de ATP é gerada através da FO. A FO é um processo que requer a ação orquestrada de cinco complexos enzimáticos distribuídos de forma especial na membrana mitocondrial interna, os quais constituem a chamada cadeia respiratória (CR). Os elétrons oriundos do NADH, H^+ e $FADH_2$, provenientes do ciclo de Krebs e de outras reações catalisadas por desidrogenases, são transferidos para a CR, tendo o O_2 comoceptor final. O processo de transferência de elétrons é acoplado à translocação de prótons através da membrana mitocondrial interna e à síntese endoergônica de ATP, tendo como força motriz a energia armazenada primariamente como gradiente eletroquímico de prótons (Babcock e Wikstöm, 1992; Voet e Voet, 2006). Os complexos enzimáticos da CR compreendem a maior parte das proteínas embebidas na membrana mitocondrial interna. Cada complexo é constituído de vários componentes protéicos que são associados com uma variedade de grupamentos prostéticos com potencial de oxirredução sucessivamente maiores (Di Donato, 2000; Voet e Voet, 2006).

Os componentes da CR são os seguintes: NADH:Q oxidorreductase (complexo I), succinato:Q oxidorreductase (complexo II), citocromo c oxidorreductase (complexo III) e citocromo c oxidase (COX) (complexo IV). Além destes complexos, a CR possui dois transportadores móveis de elétrons, que são a coenzima Q, entre os complexos I e III, e o citocromo c, entre os complexos III e IV (Berg et al., 2004c; Lehninger et al., 2007). A síntese de ATP a partir de adenosina 5'-difosfato (ADP) é realizada pelo complexo V, também conhecido como ATP sintase (Fig. 6).

O gradiente eletroquímico gerado na CR durante a transferência de elétrons para o O_2 cria uma polarização na membrana mitocondrial interna, que pode ser revertida pelo fluxo de prótons através do canal de prótons presente no componente F_o da ATP sintase. Este fluxo de prótons leva à condensação do ADP e fosfato inorgânico em ATP (Saraste, 1999; Wallace, 1999). A ATP sintase é uma enzima reversível, uma vez que pode catalisar, não apenas a síntese de ATP, usando a força próton motriz através da membrana mitocondrial interna, como também a hidrólise do ATP (Saraste, 1999).

Devido ao papel fundamental que a CR desempenha no metabolismo energético, o dano a um ou mais complexos da cadeia poderá ocasionar queda na síntese de ATP celular (Davey e Clark, 1996). Com base nesse contexto, O NO pode atuar como um importante regulador da respiração celular, uma vez que esse pode reagir com constituintes celulares, tais como o O_2^- e peróxido de hidrogênio, produzindo $ONOO^-$, o qual é extremamente citotóxico (Henry e Guissani, 1999; McCord, 2000). Trabalhos têm mostrado que o $ONOO^-$ danifica ou inibe os complexos I e II, as enzimas ATP sintase, aconitase, creatinaquinase, superóxido dismutase, o DNA mitocondrial e induz o desacoplamento mitocondrial (Konorev et al., 1998; Sharpe e Cooper, 1998; Radi et al., 2002). Corroborando com esses dados, alguns pesquisadores relataram que o NO é um potente, rápido e reversível inibidor da COX (Brown e Cooper, 1994; Radi et al., 2002; Antunes et al., 2004).

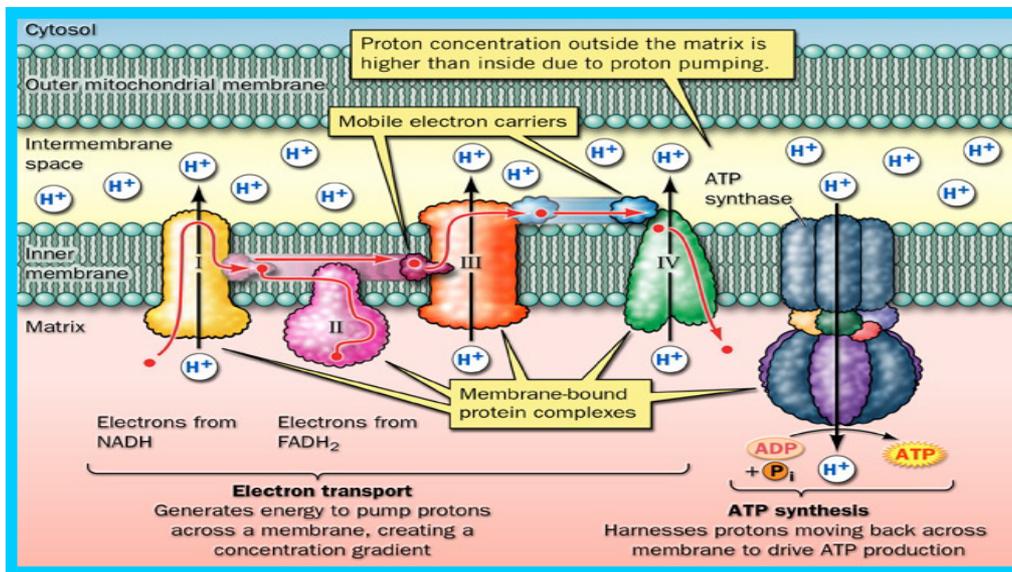


Figura 6. Fluxo de elétrons através dos quatro complexos da cadeia respiratória
(Adaptado de Smith et al., 2005).

1.7 Na⁺, K⁺ - ATPase

A Na⁺,K⁺-ATPase é uma proteína integral de membrana, encontrada na maioria das células de eucariotos, que transloca íons Na⁺ e K⁺ contra seus gradientes de concentração através da membrana plasmática, utilizando a energia proveniente da hidrólise do ATP como força motriz.

O fluxo de íons, ou seja, o transporte de três íons Na⁺ para o meio extracelular e de dois íons K⁺ para o meio intracelular mantém um gradiente eletroquímico através da membrana celular (Lingrel e Kuntzweiler, 1994; Erecinska et al., 2004). Este gradiente é utilizado como fonte energética para a manutenção do potencial de repouso e da excitabilidade das células, regulação do volume celular, pH intracelular e para o transporte de moléculas ligadas ao co-transporte de Na⁺, como glicose,

aminoácidos e neurotransmissores (Geering, 1990). Além disso, a Na^+, K^+ -ATPase consome o ATP produzido pelas células, sendo este consumo de 40 a 60% nas células neuronais (Erecinska e Silver, 1994).

A Na^+, K^+ -ATPase é uma proteína oligomérica com duas subunidades α transmembrana, que contém os sítios de ligação para Na^+ , K^+ , ATP e glicosídeos cardíacos, duas subunidades β regulatórias, na forma de glicoproteínas, e uma subunidade γ (Fig. 7). A subunidade α é formada por 1012 aminoácidos, tem massa de aproximadamente 100 kD e é responsável pelas propriedades catalíticas da enzima. A subunidade β contém em torno de 300 aminoácidos e uma massa de 60 kD. Embora não existam sítios catalíticos nesta subunidade, não é possível separá-la da subunidade α sem perda da atividade enzimática (Geering, 1990; Skou e Esmann, 1992; Erecinska et al., 2004). A subunidade γ tem peso molecular de aproximadamente 12 kDa, sendo encontrada somente nos rins. Sua função não está completamente elucidada, mas há evidências sugerindo que essa subunidade modula a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, além de pertencer a uma família de pequenas proteínas de membrana envolvidas na passagem de íons pela membrana (Therien et al., 1997; Blanco e Mercer, 1998; Kaplan, 2002).

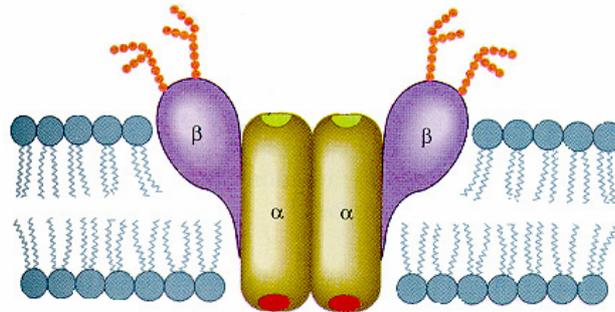


Figura 7. Estrutura da Na⁺,K⁺-ATPase (Adaptado de Voet e Voet, 2006).

Durante o ciclo catalítico da Na⁺,K⁺-ATPase a subunidade α é fosforilada e desfosforilada em um resíduo de ácido aspártico, estabilizando sua estrutura em duas formas, E₁ e E₂. (Vasilets e Schwarz, 1993; Kaplan, 2002; Devlin, 2003). A forma E₁ é estabilizada pela ligação de três íons Na⁺. A fosforilação da enzima promove a perda da afinidade pelos íons Na⁺ e liberação dos mesmos no meio extracelular. A enzima passa para a forma E₂, com alta afinidade por íons K⁺, ligando assim dois íons K⁺, o que provoca a desfosforilação da enzima, seguida pela perda da afinidade pelos íons K⁺, que são liberados no meio intracelular. Finalmente, a enzima volta à forma E₁, que tem alta afinidade por Na⁺, completando o ciclo. Esta enzima tem sua atividade inibida por glicosídeos cardíacos, como a digoxina e a ouabaína (Vasilets e Schwarz, 1993; Kaplan, 2002; Devlin, 2003; Jorgensen et al., 2003).

Dados da literatura mostram que a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase está reduzida na isquemia cerebral (Wyse et al., 2000), na epilepsia (Grisar, 1984), em crises convulsivas (Renkawek et al., 1992) e em determinadas doenças neurodegenerativas

(Lees, 1993; Hattori et al., 1998, Yu, 2003), como por exemplo na doença de Alzheimer (Liguri et al., 1990; Hattori et al., 1998).

1.8 Creatinaquinase

A enzima creatinaquinase (CK; ATP: creatina N-phosphoryl-transferase) catalisa a transferência metabolicamente reversível do grupo N-fosforil da fosfocreatina (PCr) para o ADP, regenerando desta forma o ATP (Fig. 8). A CK exerce um papel essencial na homeostasia energética de células com necessidades energéticas variáveis e intermitentes, como por exemplo, músculos esquelético e cardíaco e tecidos neuronais, como cérebro e retina (Wallimann et al., 1998).



Figura 8. Reação de transfosforilação catalisada pela enzima creatinaquinase.

As células contêm isoformas diferentes de CK: 2 isoformas citosólicas, M-CK (músculo) e B-CK (cérebro), as quais formam moléculas diméricas; e duas isoformas mitocondriais: Mi_a-CK (ubíqua) e Mi_b-CK (sarcomérica), as quais são expressas predominantemente no cérebro e no músculo estriado, respectivamente, formando moléculas diméricas e octaédricas (Wallimann et al., 1992).

As isoenzimas da CK citosólica (MM-, MB- e BB-CK) são sempre co-expressadas juntamente com a isoforma mitocondrial (Mi-CK). Usando fracionamento bioquímico e localização *in situ*, foi demonstrado que as isoenzimas da CK são solúveis, subcelularmente compartimentalizadas e unidas funcionalmente e/ou estruturalmente

com sítios de liberação de energia (glicólise e mitocôndria) ou consumo de energia (ATPases celulares, como ATPase actinmiosina e ATPase retículo sarcoplasmático), formando um sistema de distribuição de energia altamente complexo e regulado (Wallimann et al., 1992).

No tecido nervoso, a CK encontra-se em duas isoformas, uma mitocondrial (Mi_a -CK) e outra citosólica (BB-CK), acoplada funcionalmente à Na^+ , K^+ - ATPase (Blum et al., 1991). O cérebro tem capacidade de sintetizar parte da Cr de que necessita (Defalco e Davis, 1961), sendo o restante captado através de um sistema de co-transporte Na^+/Cr (Guimbal e Kilimann, 1993).

Uma vez que a energia é fundamental para o desenvolvimento e a regulação das funções cerebrais, foi postulado que o prejuízo na função da CK possa ter um papel crítico no processo neurodegenerativo que leva à perda neuronal (Tomimoto et al., 1993). A atividade da CK está reduzida em várias doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer, doença de Pick e em modelos animais de esclerose lateral amiotrófica (David et al., 1998; Aksenov et al., 2000; Wendt et al., 2002; Burklen et al., 2006). Também uma leve diminuição na atividade da CK foi observada no cérebro de pacientes com epilepsia, esquizofrenia e psicose maníaco-depressiva (Burbaeva et al., 1987, 1990). Ressalta-se que a redução observada na atividade da CK pode, nestas doenças, refletir um distúrbio no metabolismo energético cerebral. Além disso, devido a sua importante participação nos processos de manutenção de energia necessária para a mielogênese nos oligodendrócitos e para transporte iônico de neurotransmissores e mediadores entre astrócitos e neurônios, danos à sua função

podem levar a distúrbios na transdução de sinal cerebral (Wallimann et al, 1985; Kuzhikandathil e Molly, 1994; Roth et al, 1995; Zilles et al, 1995).

1.9 Ectonucleotidases

Nucleotídeos extracelulares podem ser hidrolisados por uma variedade de enzimas que estão localizadas na superfície celular ou podem ser solúveis nos meios intra e extracelulares. Nos últimos anos, consideráveis progressos têm sido feitos na caracterização de uma família de enzimas responsáveis pela degradação de nucleotídeos, conhecida como família das E-NTPDases (Zimmermann, 2001, 2006; Oses et al., 2004).

Até o momento, oito membros da família das NTPDases têm sido identificados. NTPDase 1, NTPDase 2, NTPDase 3 e NTPDase 8 são proteínas transmembrana, ancoradas à membrana plasmática pelos terminais N-terminal e C-terminal e com sítio catalítico voltado para o espaço extracelular. Essas enzimas hidrolisam tanto os nucleotídeos das purinas como das pirimidinas. As atividades catalíticas dessas enzimas estão adaptadas ao ambiente extracelular e requerem a presença de cátions divalentes como Ca^{2+} ou Mg^{2+} e pH próximo da neutralidade (Zimmermann, 2001; Bigonnesse et al., 2004).

A especificidade pelo substrato é a principal diferença entre essas enzimas. Assim, a NTPDase 1, também conhecida como CD39, ecto-apirase ou ecto-ATP difosfohidrolase, hidrolisa ATP e ADP igualmente bem, sendo a proporção de hidrólise de 1:1 (Zimmermann, 2001, 2006). A NTPDase 2 (CD39L1, ecto-ATPase) tem uma alta preferência pelo ATP, cerca de 30:1, agindo como um produtor extracelular de

ADP. A NTPDase 3 (CD39L3) e a NTPDase 8 tem propriedades funcionais intermediárias, a NTPDase 3 hidrolisando o ATP com cerca de três vezes mais eficiência do que o ADP (Smith e Kirley, 1998; Zimmermann, 2001, 2006) e a NTPDase 8 hidrolisando o ATP com cerca de duas vezes mais eficiência do que o ADP (Bigonnesse et al., 2004). Até o presente momento, as diferenças funcionais na especificidade pelo substrato e suas conseqüências nas células ou tecidos não estão completamente compreendidas (Zimmermann, 2001).

As NTPDases 4,5,6 e 7 estão ancoradas em membranas de organelas intracelulares por um ou dois domínios transmembrana e com o sítio catalítico voltado para o lúmen das organelas (Braun et al., 2000; Shi et al., 2001; Zimmermann, 2001). Dentre essas, as NTPDases 5 e 6 também podem se localizar na membrana plasmática por somente um domínio transmembrana na porção N-terminal, o que possibilita que sejam clivadas proteoliticamente e liberadas para o meio extracelular (Mulero et al., 1999).

Apesar das diferenças catalíticas e de distribuição dessas enzimas, todas as NTPDases apresentam cinco domínios com seqüências altamente conservadas, denominadas “regiões conservadas da apirase”, que possivelmente participam da formação do sítio catalítico dessas enzimas (Zimmermann, 2001).

Juntamente com as NTPDases, uma outra enzima responsável pela degradação de nucleotídeos extracelulares é a ecto-5'-nucleotidase ou CD73. Essa enzima possui uma ampla distribuição tecidual e é classificada em quatro grupos de acordo com a localização celular e as propriedades bioquímicas: uma ecto-5'-nucleotidase ancorada à membrana plasmática, uma forma solúvel derivada da ecto-5'-nucleotidase, e duas formas citoplasmáticas. A atividade catalítica da ecto-5'-nucleotidase controla os níveis

intra e extracelulares de AMP e outros nucleosídeos monofosfatados (Kawashima et al., 2000; Robson et al., 2006). Assim, a associação dessas enzimas (NTPDase e ecto-5'-nucleotidase) constitui uma via altamente sofisticada, desenvolvida com o objetivo de controlar os níveis extracelulares de ATP e adenosina, capazes de modular uma série de processos fundamentais a nível celular em muitos órgãos e tecidos, principalmente no SNC e periférico.

De acordo com a literatura, a adenosina é um nucleosídeo envolvido em muitas situações fisiológicas, possuindo um importante papel na modulação da atividade neuronal no SNC. Devido aos seus efeitos modulatórios, a adenosina é descrita como uma substância neuroprotetora e neuromoduladora em muitas áreas do SNC de mamíferos (Dunwiddie e Masino, 2001; Latini e Pedata, 2001). Apesar de seus efeitos modulatórios, a adenosina não é considerada um neurotransmissor por não ser armazenada em vesículas sinápticas e não ser liberada da mesma forma que os neurotransmissores clássicos conhecidos (Brundege e Dunwiddie, 1997). Além disso, a adenosina promove vasodilatação coronariana e atua inibindo a agregação plaquetária (Oliveira et al., 1997; Marshall, 2000).

II. OBJETIVOS

Objetivo geral

Considerando que: (1) a administração aguda de arginina reduz as atividades da Na^+, K^+ -ATPase e da acetilcolinesterase em cérebro de ratos, (2) induz estresse oxidativo, (3) provoca déficit de memória em ratos, (3) reduz o metabolismo energético em hipocampo de ratos, (4) e que os mecanismos envolvidos na disfunção neurológica característica da hiperargininemia são pouco conhecidos, o objetivo geral do nosso estudo foi investigar o efeito da Arg sobre alguns parâmetros importantes do metabolismo energético (atividade de enzimas da CR, creatina quinase e Na^+, K^+ -ATPase) e estresse oxidativo em cérebro de ratos, bem como o efeito desse aminoácido sobre a hidrólise de nucleotídeos em sinaptossomas obtidos de hipocampo de ratos e em soro de ratos. A influência dos antioxidantes, α -tocoferol e ácido ascórbico, e do L-NAME, um potente inibidor da NOS, sobre os efeitos causados pela Arg, também foram avaliados.

Este trabalho será dividido em seis capítulos como segue:

Capítulo I

Objetivos específicos

1. Investigar o efeito da administração aguda de Arg sobre alguns parâmetros de metabolismo energético, tais como: captação de glicose, produção de lactato e atividades de complexos da CR (succinato desidrogenase, complexo II e complexo IV) em cerebelo de ratos.
2. Verificar o efeito do pré-tratamento com α -tocoferol e ácido ascórbico sobre os efeitos causados pela Arg sobre o metabolismo energético em hipocampo e cerebelo de ratos.

Capítulo II

Objetivos específicos

1. Investigar o efeito da Arg sobre a produção de CO_2 a partir de glicose em meios com diferentes concentrações extracelulares de K^+ .
2. Investigar o efeito da Arg sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em membrana plasmática sináptica de fatias de hipocampo de ratos.
3. Avaliar a influência do L-NAME sobre os efeitos causados pela Arg nos parâmetros analisados a fim de investigar o possível envolvimento do NO e ou de seu derivado ONOO^- .

Capítulo III

Objetivos específicos

1. Verificar o efeito da administração aguda de Arg sobre a atividade da enzima creatina quinase em homogeneizado total e nas frações citosólica e mitocondrial de cerebelo de ratos.
2. Investigar a influência do pré-tratamento com α -tocoferol e ácido ascórbico, bem como do L-NAME, sobre os efeitos causados pela administração aguda de Arg sobre a atividade da creatina quinase.

Capítulo IV

Objetivos específicos

1. Verificar o efeito *in vivo* da administração intracerebroventricular de Arg sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos.
2. Verificar o efeito *in vivo* da administração intracerebroventricular de Arg sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo, denominados formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e capacidade antioxidante total não-enzimática (TRAP) em hipocampo de ratos.
3. Verificar o efeito do pré-tratamento com α -tocoferol e ácido ascórbico sobre os efeitos causados pela administração intracerebroventricular de Arg.
4. Verificar a influência do L-NAME sobre os efeitos causados pela administração intracerebroventricular de Arg.

Capítulo V

Objetivos específicos

1. Verificar o efeito da administração intraperitoneal de Arg sobre a atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase em sinaptossomas obtidos de hipocampo de ratos.
2. Verificar o efeito da administração intracerebroventricular de Arg sobre a atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase em sinaptossomas obtidos de hipocampo de ratos.
3. Investigar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de Arg sobre a atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase em sinaptossomas obtidos de hipocampo de ratos.
4. Realizar estudos cinéticos da atividade da NTPDase e ecto-5'-nucleotidase na presença de Arg, quando adicionada ao ensaio enzimático (*in vitro*) em sinaptossomas de hipocampo de ratos.

Capítulo VI

Objetivos específicos

1. Investigar o efeito da administração aguda de Arg sobre a hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP em soro de ratos.
2. Verificar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de Arg sobre a hidrólise dos nucleotídeos em soro de ratos.
3. Verificar a influência do L-NAME sobre os efeitos causados pela Arg sobre a hidrólise dos nucleotídeos.

OBS: todos os capítulos serão apresentados na forma de artigos científicos.

III. RESULTADOS E METODOLOGIAS

CAPÍTULO I – ARTIGO 01

α -tocopherol and ascorbic acid administration prevents the impairment of brain energy metabolism of hyperargininemic rats

Débora Delwing, Bárbara Tagliari, Fábria Chiarani, Clovis M.D. Wannmacher, Moacir Wajner and Angela Terezinha de Souza Wyse

Periódico: Cellular and Molecular Neurobiology
Status: Publicado

CAPÍTULO II – ARTIGO 02

Inhibition of CO₂ production from glucose by arginine in brain slices of rats

Débora Delwing, Francieli M. Stefanello, Moacir Wajner, Marcos L.S. Perry and Angela

T.S. Wyse*

Periódico: Metabolic Brain Disease
Status: Publicado

CAPÍTULO III – ARTIGO 03

Arginine Administration Reduces Creatine Kinase Activity in Rat Cerebellum

Débora Delwing, Andrea R. Cornélio, Moacir Wajner, Clóvis M.D. Wannmacher and
Angela T.S. Wyse *

Periódico: Metabolic Brain Disease
Status: Publicado

CAPÍTULO IV– ARTIGO 04

**Protective effect of antioxidants on brain oxidative damage caused by
intracerebroventricular arginine administration**

Débora Delwing, Daniela Delwing, Caren S. Bavaresco and Angela T.S. Wyse*

Periódico: Brain Research
Status: Enviado

CAPÍTULO V – ARTIGO 05

NTPDase and 5'-nucleotidase activities of synaptosomes from hippocampus of rats subjected to hyperargininemia

Débora Delwing¹, Daniela Delwing¹, Manuela C.F. Gonçalves¹, João J.F. Sarkis¹ and Angela T.S. Wyse^{1,2}

Periódico: Neurochemical Research
Status: Publicado

CAPÍTULO VI – ARTIGO 06

**L-NAME administration prevent the inhibition of nucleotide hydrolysis by rat
blood serum subjected to hyperargininemia**

Débora Delwing¹, Manuela C.F. Gonçalves¹, João J.F. Sarkis and Angela T.S. Wyse*

Periódico: Amino Acid
Status: Publicado

IV. DISCUSSÃO

Os EIM do ciclo da uréia compreendem desordens metabólicas nas quais há uma deficiência enzimática em qualquer uma das etapas da rota ureagênica, tendo como conseqüência o acúmulo de átomos de nitrogênio numa variedade de moléculas, cujo padrão varia conforme o ponto de bloqueio enzimático. Uma característica entre as desordens do ciclo da uréia é o aumento dos níveis plasmáticos de amônia (Brusilow e Horwich, 2001).

A hiperargininemia é um EI do ciclo da uréia, causada pela deficiência de arginase, a qual é a quinta enzima do ciclo da uréia e que hidrolisa Arg em uréia e ornitina. Pacientes afetados por essa doença apresentam acúmulo de Arg e seus derivados (compostos guanidínicos) nos tecidos e fluídos biológicos. De forma diversa às demais desordens que alteram a rota ureagênica, as concentrações plasmáticas de amônia encontram-se normais ou levemente aumentadas (Cederbaum, 1977; Snyderman, 1977).

Pacientes hiperargininêmicos apresentam sintomas clínicos que incluem vômitos, irritabilidade, letargia, retardo mental, espasticidade, convulsões e coma. A severa espasticidade é característica de pacientes hiperargininêmicos, não estando presente nas demais enzimopatias do ciclo da uréia. Todavia, estes sintomas neurológicos não são explicados unicamente pela hiperamonemia ou hiperargininemia, sugerindo-se que outros fatores devam contribuir com o aparecimento dos mesmos, tais como o aumento dos níveis de compostos guanidínicos e/ou NO (Mizutani et al., 1987).

Estudos realizados no nosso grupo de pesquisa mostraram que a administração aguda de Arg provocou redução significativa na atividade das enzimas Na^+, K^+ -ATPase (Wyse et al., 2001) e catalase (Delwing et al., 2002), aumentou significativamente a peroxidação lipídica (quimiluminescência) e diminuiu a capacidade antioxidante total não-enzimática (TRAP) em cérebro de ratos (Wyse et al., 2001). Também mostramos que a administração aguda de Arg provocou redução no metabolismo energético hipocampal (Delwing et al., 2003) e diminuição de memória em ratos (Reis et al., 2002). Estes efeitos foram prevenidos pela administração simultânea de Arg e L-NAME, sugerindo que a Arg afeta esses parâmetros através da produção de NO e /ou ONOO⁻.

No presente trabalho, utilizamos o modelo experimental animal de hiperargininemia descrito por Buchmann e colaboradores (1996), os quais relataram que os níveis sanguíneos de Arg aumentam sete vezes após a administração de Arg, enquanto que a concentração cerebral de Arg aumenta 2,3 vezes comparada aos ratos tratados com salina. Os mesmos autores relataram um aumento da concentração de citrulina no cérebro de ratos após a administração de Arg, o que sugere aumento na formação de NO.

Primeiramente, investigamos o efeito da administração aguda de Arg sobre alguns parâmetros do metabolismo energético, entre eles, a captação de glicose, liberação de lactato e atividade de enzimas chave da CR em cerebelo de ratos. O cerebelo foi utilizado nesses experimentos por ser uma estrutura cerebral essencial para a atividade motora, a qual se encontra comprometida em pacientes hiperargininêmicos (Blouin et al., 2004; Debaere et al., 2004). Nossos resultados

mostraram que a administração aguda de Arg reduziu significativamente a captação de glicose e aumentou a produção de lactato em cerebelo de ratos, sugerindo que a administração desse aminoácido provavelmente comprometeu a glicólise aeróbica e aumentou a glicólise anaeróbica. Esta inversão na utilização do metabolismo aeróbico pelo anaeróbico poderá ocasionar diminuição na produção de energia celular, provavelmente através da redução da produção de ATP. Esses resultados estão de acordo com nossos estudos anteriores, onde mostramos que a administração aguda de Arg comprometeu os mesmos parâmetros em hipocampo de ratos (Delwing et al., 2003).

Com o propósito de esclarecer a redução energética cerebelar provocada pela administração de Arg, avaliamos a função da CR medindo as atividades de complexos cruciais para a função normal da CR: a SDH, o complexo II e a COX (complexo IV), os quais são considerados marcadores de função neural. Nós observamos que a Arg não alterou a atividade da COX, mas inibiu significativamente as atividades da SDH e do complexo II. Portanto, é possível que a redução nas atividades dessas enzimas causada por altos níveis de Arg, possa explicar a redução da captação de glicose, bem como o aumento da produção de lactato. Resultado similar foi verificado em hipocampo de ratos (Delwing et al., 2003).

Dados da literatura sugerem que distúrbios secundários do metabolismo energético desempenham papel importante nos distúrbios fisiopatológicos de doenças neurodegenerativas, incluindo as doenças de Alzheimer e Parkinson (Cassarino e Bennet, 1999; Chinta e Andersen, 2006; Onyango e Khan, 2006).

Considerando que a proteção antioxidante do α -tocoferol é crucial para uma respiração mitocondrial cerebral eficiente e que o cerebelo possui baixa concentração desta vitamina (Vatassery, 1998, 2004), neste trabalho nós também verificamos se o pré-tratamento com os antioxidantes α -tocoferol e ácido ascórbico seria capaz de prevenir o comprometimento do metabolismo energético causado pela Arg em cerebelo e também em hipocampo de ratos. O hipocampo é uma estrutura cerebral essencial para o aprendizado, o qual se encontra comprometido em pacientes hiperargininêmicos (Squire, 2004). Nossos resultados mostraram que esses antioxidantes foram capazes de prevenir o aumento da liberação de lactato, bem como a diminuição da captação de glicose e das atividades da SDH e do complexo II provocados pela Arg, em ambas as estruturas cerebrais. Esses dados sugerem que radicais livres removidos por α -tocoferol e ácido ascórbico estão provavelmente envolvidos nos efeitos causados pela Arg sobre os vários parâmetros de metabolismo energético testados.

Nossos resultados estão de acordo com outros estudos, os quais mostram os efeitos protetores do α -tocoferol contra o dano oxidativo tecidual, com ênfase no SNC (Anderson et al., 1988; Hara et al., 1990; Vatassery et al., 2004). Nesse contexto, o α -tocoferol é considerado o principal antioxidante lipofílico em humanos, sendo essencial para uma função cerebral normal (Vatassery, 1998). Essa vitamina é capaz de impedir a propagação da peroxidação lipídica por radicais livres (Burton et al., 1990), produzindo o radical tocoferil. O ácido ascórbico é um antioxidante ativo contra radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 2000) sendo um doador de elétrons, um agente

reduzidor, prevenindo a oxidação de outros compostos. Essa vitamina é hidrossolúvel e possui um papel importante na regeneração do α -tocoferol. Durante o processo, o α -tocoferol é convertido à radical tocoferil, necessitando de ácido ascórbico para sua regeneração à forma reduzida (α -tocoferol) (Frei et al., 1990; Buettner, 1993; Carr and Frei, 1999).

Considerando que a Arg inibiu significativamente a atividade do complexo II, cuja atividade enzimática é fundamental para o funcionamento da CR e que um bloqueio da CR pode acarretar outras alterações mitocondriais, como inibição do ciclo do ácido cítrico, nosso próximo objetivo foi investigar os efeitos *in vivo* da Arg sobre a produção de CO_2 a partir de glicose em fatias de hipocampo de ratos adultos incubadas em meio com concentrações fisiológica (2,7 mM) e elevada (50,0 mM) de K^+ extracelular. A glicose é o principal composto energético utilizado pelo SNC, sendo quase completamente oxidada a CO_2 e H_2O no metabolismo aeróbico (Berg et al., 2004b). Nossos experimentos mostraram que na presença de uma concentração extracelular fisiológica de K^+ , a Arg inibiu significativamente a produção de CO_2 a partir de glicose em fatias de hipocampo de ratos, não alterando a produção de CO_2 a partir de glicose em meio com alta concentração extracelular de K^+ . Tem sido demonstrado que a estimulação do metabolismo por ativação funcional é dependente da atividade da Na^+, K^+ -ATPase, a qual contribui para a manutenção dos níveis basais de K^+ , os quais *in vivo* são em torno de 3 mM. Em condições patológicas, como convulsão ou depressão, tais níveis podem aumentar atingindo valores em torno de 50-80 mM (Erecinska and Silver, 1994). Nesse contexto, em nosso estudo verificamos um

aumento significativo na produção de CO₂ a partir de glicose no meio com alta concentração extracelular de K⁺ em comparação ao meio com concentração fisiológica de K⁺ extracelular.

Com o propósito de estudar um possível mecanismo pelo qual a Arg inibiu a produção de CO₂ a partir de glicose em meio de incubação com concentração extracelular fisiológica de K⁺, nós também investigamos os efeitos *in vitro* de diferentes concentrações de Arg (0,1-1,5 mM) sobre a produção de CO₂ a partir de glicose em fatias de hipocampo. Ao contrário dos estudos *in vivo*, não observamos alterações significativas na produção de CO₂ a partir de glicose *in vitro*, o que sugere que a inibição da produção de CO₂ a partir de glicose observada *in vivo* é provavelmente induzida por efeitos indiretos da Arg, através de seus metabólitos e não pelo próprio aminoácido. De acordo com estes resultados e sabendo que altos níveis de Arg, encontrados em pacientes hiperargininêmicos, resultam em aumento dos níveis cerebrais de NO, nós avaliamos a influência do L-NAME, um potente inibidor da NOS, sobre o efeito inibidor da Arg sobre a produção de CO₂ a partir de glicose, a fim de verificar o possível envolvimento do NO e/ou seu derivado ONOO⁻ em tal efeito. Nós verificamos que a administração de L-NAME, por si só não alterou a produção de CO₂ a partir de glicose, mas preveniu o efeito inibidor da Arg, indicando que o NO e/ou seu derivado ONOO⁻ está(ão) envolvido(s) no efeito inibidor da Arg sobre a produção de CO₂ a partir de glicose em fatias de hipocampo.

Tendo conhecimento de que a Na⁺,K⁺-ATPase, proteína integral de membrana, contribui para a manutenção dos níveis basais de K⁺ (Erecinska and Silver, 1994) e que essa enzima pode ser inibida por NO e seus derivados (Wyse et al., 2001; Yousef

et al., 2002), nós também investigamos o efeito da Arg sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em membrana plasmática sináptica de fatias de hipocampo de ratos. Nossos resultados mostraram que a Arg inibiu significativamente a atividade da Na^+, K^+ -ATPase. Em concordância com esse resultado, estudos prévios do nosso laboratório mostraram que a Arg reduziu significativamente a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos e que esse efeito foi prevenido pela administração de L-NAME (Reis et al., 2002), sugerindo que o efeito protetor do inibidor da NOS pode ser mediado por sua habilidade em prevenir o desenvolvimento do estresse oxidativo (Avrova et al., 1999). De fato, estudos relatam que a Arg aumenta a produção de NO em fatias de cérebro de ratos e têm relacionado altas concentrações de NO com neurotoxicidade, possivelmente através de atividade excitotóxica (Bruneli et al., 1997; Sarti et al., 1999). Além disso, Sato e colaboradores (1995) propõem que o NO e seus derivados, como o ONOO^- , podem inibir a atividade da Na^+, K^+ -ATPase por interagir com grupos SH no sítio ativo da enzima.

Nossos resultados indicam que a Arg leva à produção de radicais livres, os quais possivelmente são responsáveis pela inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase induzida pela Arg e estão de acordo com estudos anteriores realizados em nosso laboratório, onde mostramos que a Arg induz o estresse oxidativo cerebral (Wyse et al., 2001; Delwing et al., 2002). Nesse cenário, nossos resultados sugerem que a redução da produção de CO_2 causada pela Arg foi provavelmente mediada pelo NO e/ou seus derivados, os quais podem agir inibindo a atividade da Na^+, K^+ -ATPase.

Dando continuidade aos nossos estudos e considerando que a Arg compromete o metabolismo energético cerebral e que a enzima CK desempenha um papel

importante na manutenção da homeostasia energética cerebral, investigamos os efeitos *in vivo* da hiperargininemia quimicamente induzida sobre a atividade da CK em homogeneizado total, bem como nas frações citosólica e mitocondrial preparadas a partir de cérebro de ratos. Nossos resultados mostraram que a administração aguda de Arg reduziu significativamente a atividade da CK em homogeneizado total e na fração citosólica em cerebelo de ratos. No entanto, a Arg não alterou a atividade da CK na fração mitocondrial. Tendo conhecimento através de estudos prévios de que a Arg induz o estresse oxidativo (Wyse et al., 2001; Delwing et al., 2002), nós também verificamos o possível envolvimento do NO ou de outros radicais livres sobre os efeitos causados pela Arg, uma vez que a CK possui resíduos de cisteína em sua estrutura, que podem ser alvo para o NO e outros radicais livres, os quais inativam a enzima (Yuan et al., 1992; Mekhfi et al., 1996; Wolosker et al., 1996; Konorev et al., 1998; Stachowiak et al., 1998). Com esse propósito, nós investigamos a influência dos antioxidantes α -tocoferol e ácido ascórbico e do L-NAME sobre os efeitos causados pela Arg sobre a atividade da CK. Nós observamos que a injeção de uma alta dose de L-NAME (20.0 mg/Kg), um potente inibidor da NOS, foi capaz de prevenir o efeito inibidor da Arg, sugerindo que o NO e/ou seu derivado ONOO⁻ está(ão) envolvido(s) na redução causada pela Arg na atividade da CK cerebelar. Além disso, o pré-tratamento com os antioxidantes α -tocoferol (o qual remove radical peroxil e é capaz de interromper o processo de lipoperoxidação) e ácido ascórbico (o qual remove radicais hidroxil e superóxido) também preveniu a inibição da CK causada pela Arg em homogeneizado total e na fração citosólica de cerebelo de ratos. Esses resultados

indicam, mais uma vez, que a Arg induz a produção de radicais livres, os quais são provavelmente responsáveis pela inibição da CK provocada por esse aminoácido e novamente corroboram com nossos resultados anteriores, onde mostramos que a administração aguda de Arg induz o estresse oxidativo (Wyse et al., 2001) e diminui a atividade da catalase (Delwing et al., 2002) em cérebro de ratos.

Tem sido relatado que a atividade da CK diminui após a exposição cerebral a agentes que promovem a geração de radicais livres (Wolosker et al., 1996; Arstall et al., 1998; Konorev et al., 1998; Stachowiak et al., 1998) e a reagentes que reagem com grupos tióis (Gross et al., 1996; Wolosker et al., 1996) provavelmente por oxidação dos grupamentos sulfidril localizados na enzima. A CK possui 8 grupamentos sulfidril por monômero. Um resíduo altamente conservado de cisteína (Cys-283 na isoforma citosólica e Cys-278 na isoforma mitocondrial) está localizado próximo ao sítio catalítico da CK e é importante para a plena atividade enzimática. Acredita-se que este resíduo interage com os grupamentos guanidino da Cr sendo responsável pela orientação correta do substrato no sítio ativo. Esses grupamentos sulfidril têm sido apontados como os principais alvos para a inativação química da CK por várias substâncias, não somente através de reações de oxidação como também por outras modificações pós-translacionais, como ocorre com o NO, via reações de S-nitrosilação, ONOO⁻ pela formação de ácido sulfênico ou acrilamida por alquilação. Além disso, foi relatado que o NO, ONOO⁻ e outros radicais livres inativam a enzima em músculo esquelético (Wolosker et al., 1996) e cardíaco (Yuan et al., 1992; Mekhfi et al., 1996; Stachowiak et al., 1998). Dessa forma, várias estratégias têm sido desenvolvidas para bloquear diferentes etapas da cascata de eventos que leva à

injúria tecidual decorrente do estresse oxidativo. Entre elas, a prevenção da geração de espécies reativas do oxigênio e sua neutralização por antioxidantes têm despertado especial interesse (Choi, 1990), tanto para a compreensão dos mecanismos protetores fisiológicos como para fins terapêuticos.

A redução da atividade da CK tem sido relacionada ao desenvolvimento de diversos estados patológicos envolvendo os tecidos que apresentam alta necessidade energética, como o cérebro, o músculo esquelético e o músculo cardíaco. Diminuição na atividade da CK tem sido encontrada em diversas doenças neurodegenerativas, incluindo a Doença de Alzheimer, a Doença de Pick, epilepsia, esquizofrenia e psicose maníaco-depressiva. Nossos resultados mostraram que a Arg reduz a atividade da CK em cerebelo de ratos, provavelmente através da geração de NO e/ou ONOO⁻ e/ou outros radicais livres, prejudicando assim a homeostasia energética cerebral, o que possivelmente contribui para o dano cerebral encontrado em pacientes hiperargininêmicos. Além disso, trabalhos realizados em nosso laboratório mostraram que alguns aminoácidos acumulados em certas doenças genéticas, tais como, fenilalanina (Costabeber et al., 2003), leucina (Pilla et al., 2003), prolina (Kessler et al., 2003), triptofano (Cornelio et al., 2004) e cistina (Fleck et al., 2005) inibem a atividade da CK em cérebro de ratos.

Tendo em vista que a administração intraperitoneal de Arg induz o estresse oxidativo e compromete o metabolismo energético cerebral, decidimos estender nosso estudo, usando outro modelo experimental. Assim, primeiramente investigamos o efeito da infusão intracerebroventricular de Arg [solução a 0,1 (valor indivíduos normais), 0,5 e 1,5 mM (valores encontrados na doença)] sobre a atividade da Na⁺,K⁺-

ATPase em membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos sacrificados 30 min, 1 h e 4 hs após a administração. Nossos resultados mostraram que a infusão de Arg (1,5 mM) inibiu significativamente a atividade da enzima 1 h após a sua administração, não alterando a mesma nos demais intervalos de tempo testados. Embora não tenhamos medido as concentrações hipocâmpais de Arg e de seus metabólitos nestes períodos após a administração de Arg, supomos que este efeito transitório ocorreu no momento em que havia altas concentrações de Arg ou de seus metabólitos no hipocampo do animal.

Na etapa seguinte de nosso estudo, verificamos o efeito da infusão intracerebroventricular de Arg (solução a 0,1, 0,5 e 1,5 mM) sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo, denominados formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), o qual é usado como um índice de dano a lipídeos e capacidade antioxidante total não-enzimática (TRAP) em hipocampo de ratos 30 min, 1 h e 4 hs após a administração de Arg. Nós verificamos que a Arg (1,5 mM) aumentou significativamente os níveis de TBA-RS, o que indica que esse aminoácido induz a lipoperoxidação e reduziu significativamente o TRAP, o que sugere um prejuízo na defesa antioxidante total não-enzimática tecidual. Ambos os resultados foram observados 1 h após a infusão de Arg. Uma vez que o estresse oxidativo é conceituado como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e defesas antioxidantes (Halliwell e Whiteman, 2004), nossos resultados sugerem que a Arg induz o estresse oxidativo cerebral. Nexto contexto, cabe enfatizar que o cérebro é altamente suscetível ao estresse oxidativo, uma vez que este possui baixa defesa antioxidante quando comparado aos demais tecidos, grande consumo de O₂ por

unidade de massa de tecido, alto conteúdo lipídico das membranas neuronais (ácidos graxos de cadeia lateral poliinsaturada) que sofrem peroxidação por radicais livres e áreas com altas concentrações de ferro que estimulam a reação de Fenton com a subsequente produção de radical hidroxila (Reznick and Packer, 1993; Halliwell, 1996; Floyd, 1999).

Esses resultados corroboram com nossos estudos prévios, onde mostramos que a administração intraperitoneal de Arg aumentou a quimiluminescência e reduziu o TRAP (Wyse et al., 2001). Tendo conhecimento de que as altas concentrações de Arg aumentam a produção de NO e que as espécies reativas NO e O_2^- são instáveis e reagem avidamente formando um radical livre mais danoso, o $ONOO^-$ (Rubbo et al., 1994; Nelson et al., 2003), que promove lipoperoxidação (Darley-Usmar et al., 1995) e inibe a atividade da Na^+,K^+ -ATPase por reagir com grupos sulfidrilas essenciais para sua atividade catalítica (Radi et al., 1991; Kurella et al., 1999; Wang et al., 2003), podemos sugerir que a inibição da Na^+,K^+ -ATPase provocada pela Arg provavelmente ocorreu através da geração de NO e/ou $ONOO^-$ e/ou outros radicais livres. Todas as alterações foram constatadas 1 h após a infusão de Arg, tempo em que possivelmente os níveis dessas espécies reativas e radicais estavam elevados. Nesse contexto, verificamos também a influência dos antioxidantes α -tocoferol e ácido ascórbico e do L-NAME sobre os efeitos causados pela Arg sobre a atividade da Na^+,K^+ -ATPase, TBA-RS e TRAP. Nossos resultados mostraram que essas substâncias por si só não alteraram a atividade da enzima, mas preveniram a inibição causada pela Arg sobre a atividade da Na^+,K^+ -ATPase. Embora não se conheça o mecanismo exato pelo qual a

Arg inibe a atividade dessa enzima, nossos dados corroboram com nossa hipótese inicial, onde sugerimos que a inibição da enzima provocada pela Arg provavelmente ocorra através da geração de NO e/ou ONOO⁻ e/ou outros radicais livres, possivelmente através da oxidação dos grupos SH da enzima e/ou por peroxidação dos lipídeos da membrana, na qual a enzima está embebida. Também verificamos que os antioxidantes α -tocoferol e ácido ascórbico preveniram completamente os efeitos da Arg sobre o TBA-RS e o TRAP. Por outro lado, o L-NAME preveniu completamente o aumento do TBA-RS, mas não a redução do TRAP causada pela Arg, sugerindo que as espécies reativas de oxigênio envolvidas neste efeito provavelmente sejam aquelas removidas pelo α -tocoferol e ácido ascórbico.

A fim de dar continuidade aos nossos estudos e ampliar nosso campo de pesquisa, decidimos investigar o efeito da administração de Arg sobre a hidrólise dos nucleotídeos adenínicos ATP, ADP e AMP em sinaptossomas de hipocampo de ratos. Nucleotídeos extracelulares podem ser hidrolisados por uma variedade de enzimas que estão localizadas na superfície celular ou que podem ser solúveis nos meios intra e extracelulares. Nos últimos anos, consideráveis progressos têm sido feitos na caracterização de uma família de enzimas responsáveis pela degradação de nucleotídeos, conhecida como família das E-NTPDases (Zimmermann, 2001, 2006).

Os nucleotídeos adenínicos são rapidamente hidrolisados e convertidos a adenosina no espaço extracelular (Dunwiddie et al., 1997). NTPDase é a denominação utilizada para as enzimas que hidrolisam ATP, ADP e outros trifosfo- e difosfo-nucleosídeos a monofosfonucleosídeos e fosfato inorgânico na presença de

íons Ca^{2+} ou Mg^{2+} (Zimmermann, 2001, 2006). O AMP formado, por ação da NTPDase, é metabolizado à adenosina por ação da enzima ecto-5'-nucleotidase (Zimmermann, 1996). Assim, a associação dessas enzimas pode controlar as concentrações extracelulares de ATP, ADP e AMP através do aumento ou diminuição de suas hidrólises com um conseqüente aumento ou diminuição nos níveis de adenosina, um metabólito protetor natural (Bruno et al., 2002), o qual apresenta propriedades anticonvulsivante e neuroprotetora (Dunwiddie e Masino, 2001).

Nós verificamos que a administração intraperitoneal de Arg (uma ou três injeções) não alterou a hidrólise dos nucleotídeos. Por outro lado, a infusão intracerebroventricular de Arg (solução a 1,5 mM) reduziu significativamente a hidrólise do ATP (32%), ADP (30%) e AMP (21%) em sinaptossomas de hipocampo de ratos. É provável que quando administrada intraperitonealmente, a Arg não atinja no cérebro a concentração necessária para reduzir a atividade da NTPDase e da ecto-5'-nucleotidase. Interessantemente, estudos prévios do nosso laboratório mostraram que a administração intraperitoneal de Arg inibiu a atividade das enzimas Na^+, K^+ -ATPase e acetilcolinesterase em cérebro de ratos (Wyse et al., 2001, 2004). Esse fato sugere que as enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase são relativamente mais resistentes aos efeitos da administração de Arg, quando comparadas a outras enzimas.

Na etapa seguinte, verificamos os efeitos *in vitro* de diferentes concentrações de Arg (0,1-1,5 mM) sobre a atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase em sinaptossomas de hipocampo de ratos. Nossos resultados mostraram que a adição de Arg 1,5 mM ao meio de incubação reduziu significativamente a hidrólise do ATP (19%), ADP (17%) e AMP (23%) em sinaptossomas de hipocampo de ratos, sugerindo

assim, um efeito inibitório direto da Arg sobre as enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase. Considerando nossos resultados, nós também realizamos estudos cinéticos de inibição da atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase. Nossos resultados mostraram que a Arg inibe a atividade dessas enzimas de forma acompetitiva em relação aos substratos ATP, ADP e AMP. Esses dados sugerem que a Arg não altera a atividade da NTPDase e ecto-5'-nucleotidase por interagir diretamente com o sítio de ligação do ATP, ADP (NTPDase) e AMP (ecto-5'-nucleotidase), mas por se ligar a outro centro de ligação presente em tais enzimas.

Em resumo, nossos resultados mostraram que a administração intracerebroventricular de Arg e a adição desse aminoácido ao ensaio enzimático (estudos *in vitro*) afetou a cascata enzimática responsável pela hidrólise de ATP a adenosina em sinaptossomas de hipocampo de ratos, interferindo assim, na produção de adenosina, provavelmente reduzindo os níveis desse composto e aumentando os níveis extracelulares de ATP no SNC. Uma vez que o ATP é um importante neurotransmissor excitatório no SNC, a inibição da hidrólise do ATP causada pela Arg poderá desencadear uma série de processos relacionados a excitabilidade cerebral. Esses resultados sugerem que alterações na hidrólise dos nucleotídeos possam estar envolvidas na disfunção cerebral causada pela hiperargininemia. Dados da literatura também mostram que altas concentrações de ATP extracelular podem induzir morte celular em diferentes tipos celulares, incluindo timócitos, hepatócitos, células microgliais e mielóides (Tinton et al., 1993; Chvatchko et al., 1996; Ferrari et al., 1997, 1999; Di Virgilio, 2000). Além disso, a análise cinética revelou que o efeito inibitório da Arg foi do tipo não competitivo em relação ao ATP, ADP e AMP. O conhecimento do

tipo de inibição é importante, uma vez que pode ser útil para o desenvolvimento de drogas que impeçam os efeitos deletérios da hiperargininemia.

Tendo conhecimento de que a Arg alterou a cascata enzimática responsável pela hidrólise de ATP à adenosina em sinaptossomas de hipocampo de ratos e sabendo-se que a NTPDase possui diferentes papéis fisiológicos dependendo do tecido em que se encontra, nosso próximo objetivo foi verificar os efeitos *in vivo* e *in vitro* da Arg sobre a hidrólise do ATP, ADP e AMP em soro de ratos. Nas células endoteliais, seu principal efeito está relacionado com a hidrólise do ADP, uma vez que este é um conhecido agente indutor de agregação plaquetária. Desta forma a NTPDase desempenha um importante papel na hemostasia e tromborregulação (Kaczmarek et al., 1996; Burnstock e Williams, 2000).

Nossos resultados mostraram que a administração aguda de Arg (três injeções) reduziu significativamente a hidrólise do ATP (34%), ADP (28%) e AMP (29%). Por outro lado, a adição da Arg ao meio de incubação (estudos *in vitro*) não alterou a hidrólise desses nucleotídeos, sugerindo um efeito indireto desse aminoácido sobre a hidrólise dos nucleotídeos, promovido por metabólitos da Arg.

Tendo em vista, através de nossos estudos, que a Arg induz o estresse oxidativo e considerando o fato de que altos níveis de Arg aumentam a produção de NO, nós também investigamos a influência do L-NAME sobre os efeitos produzidos pela administração de Arg sobre a hidrólise dos nucleotídeos com o objetivo de analisar o possível envolvimento do NO e/ou seu derivado, ONOO⁻, sobre tais efeitos. Nós observamos que a injeção de uma alta dose de L-NAME (20.0 mg/Kg) por si só não alterou a hidrólise do ATP, ADP e AMP, mas quando administrada simultaneamente

com a Arg preveniu a inibição da hidrólise dos nucleotídeos em soro de ratos, indicando que essa inibição causada pela administração de Arg foi provavelmente mediada via formação do NO. Neste contexto, cabe salientar que a formação excessiva do NO torna-o um importante mediador de neurotoxicidade (Dawson e Dawson, 1996). Além disso, os efeitos neurotóxicos do NO têm sido relatados em uma série de doenças neurodegenerativas, como as doenças de Parkinson e Alzheimer (Law et al., 2001).

Por fim, considerando que o bom funcionamento da “cadeia enzimática” (NTPDase e ecto-5'-nucleotidase) representa um mecanismo crítico para o controle da homeostasia vascular, contribuindo para a inibição de eventos trombogênicos, podemos propor que o aumento nos níveis do nucleotídeo ADP sérico, decorrente da inibição da hidrólise do ATP, ADP e AMP causada pela Arg via formação de NO, poderá causar agregação plaquetária em pacientes hiperargininêmicos.

Assim, considerando nossos resultados anteriores em que mostramos que a administração aguda de Arg diminui a atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase em sinaptossomas de hipocampo de ratos e os resultados acima citados, podemos propor que a determinação da atividade da NTPDase e ecto-5'-nucleotidase em soro possa ser utilizada como um marcador periférico para os efeitos neurotóxicos da Arg na hiperargininemia.

Embora pouco se conheça sobre os mecanismos responsáveis pelo dano cerebral apresentado por pacientes hiperargininêmicos, nosso trabalho mostrou que a Arg reduziu o metabolismo energético cerebral, uma vez que houve redução na captação de glicose, aumento da liberação de lactato, diminuição na atividade do

complexo II e da SDH da CR, redução na produção de CO₂ a partir de glicose e redução na atividade das enzimas CK e Na⁺,K⁺-ATPase. Esses efeitos provavelmente ocorreram através da geração de NO e/ou ONOO⁻ e/ou outros radicais livres, visto que antioxidantes importantes como o α -tocoferol e ácido ascórbico e o L-NAME preveniram tais efeitos. Verificamos também que a Arg induziu o estresse oxidativo, visto que a infusão intracerebroventricular de Arg acarretou em aumento do TBA-RS e diminuição do TRAP, corroborando assim, com nossos prévios resultados (Wyse et al., 2001). Em adição, também mostramos que a Arg altera a hidrólise de nucleotídeos adenínicos em sinaptossomas de hipocampo de ratos, bem como em soro de ratos. Nossos resultados em conjunto, poderão auxiliar no entendimento dos sintomas e distúrbios neurológicos observados em pacientes hiperargininêmicos. Além disso, se esses resultados forem confirmados em humanos, poderíamos sugerir que a suplementação com antioxidantes possa ser utilizada como uma estratégia terapêutica no tratamento da hiperargininemia.

V. CONCLUSÕES

A administração aguda de Arg:

- Reduziu significativamente a captação de glicose e aumentou a produção de lactato em cerebelo de ratos
- Não alterou a atividade da COX em cerebelo de ratos
- Inibiu significativamente as atividades da SDH e do complexo II em cerebelo de ratos
- Inibiu a produção de CO₂ a partir de glicose em fatias de hipocampo de ratos na presença de uma concentração extracelular fisiológica de K⁺, não alterando a produção de CO₂ a partir de glicose em meio com alta concentração extracelular de K⁺
- Inibiu significativamente a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em membrana plasmática sináptica de fatias de hipocampo de ratos
- Reduziu significativamente a atividade da CK em homogeneizado total e na fração citosólica em cerebelo de ratos
- Não alterou a hidrólise dos nucleotídeos em sinaptossomas de hipocampo de ratos
- Reduziu significativamente a hidrólise do ATP, ADP e AMP em soro de ratos

A administração intracerebroventricular de Arg (solução a 1,5 mM):

- Inibiu significativamente a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos
- Aumentou significativamente os níveis de TBA-RS em hipocampo de ratos
- Reduziu significativamente o TRAP em hipocampo de ratos

- Reduziu significativamente a hidrólise do ATP (32%), ADP (30%) e AMP (21%) em sinaptossomas de hipocampo de ratos

A adição de Arg ao ensaio enzimático:

- Não alterou a produção de CO₂ a partir de glicose em fatias de hipocampo de ratos
- Reduziu significativamente a hidrólise do ATP (19%), ADP (17%) e AMP (23%) em sinaptossomas de hipocampo de ratos
- Não alterou a hidrólise dos nucleotídeos adenínicos (ATP, ADP e AMP) em soro de ratos

A administração simultânea de Arg e L-NAME:

- Preveniu a redução da produção de CO₂ a partir de glicose causada pela Arg em fatias de hipocampo de ratos
- Preveniu a inibição da CK causada pela Arg em homogeneizado total e na fração citosólica de cerebelo de ratos
- Preveniu a inibição causada pela Arg administrada intracerebroventricularmente sobre a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos
- Preveniu o aumento do TBA-RS causado pela administração intracerebroventricular de Arg em hipocampo de ratos
- Preveniu a inibição da hidrólise dos nucleotídeos em soro de ratos

O pré-tratamento com α -tocoferol e ácido ascórbico:

- Preveniu o aumento da liberação de lactato, bem como, a diminuição da captação de glicose e das atividades da SDH e do complexo II provocados pela Arg em hipocampo e cerebelo de ratos
- Preveniu a inibição da CK causada pela Arg em homogeneizado total e na fração citosólica de cerebelo de ratos
- Preveniu a inibição causada pela Arg administrada intracerebroventricularmente sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos
- Preveniu o aumento do TBA-RS e a redução do TRAP causada pela administração intracerebroventricular de Arg em hipocampo de ratos

Estudos cinéticos de inibição:

- Arg inibe a atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase de forma não competitiva em relação aos substratos ATP, ADP e AMP

Os resultados do presente trabalho em conjunto, poderão auxiliar no entendimento dos sintomas e distúrbios neurológicos observados em pacientes hiperargininêmicos. Além disso, se esses resultados forem confirmados em humanos, poderíamos sugerir que a suplementação com antioxidantes possa ser utilizada como uma estratégia terapêutica no tratamento da hiperargininemia.

ESQUEMA RESUMIDO DOS RESULTADOS OBTIDOS

1. Administração *in vitro* e *in vivo* [intraperitoneal (I.P.) e intracerebroventricular (I.C.V)] da arginina sobre alguns parâmetros bioquímicos.

	<i>IN VITRO</i>	I.P.	I.C.V
Captação de glicose		↓	
Liberação de lactato		↓	
SDH		↓	
Complexo II		↓	
Citocromo C oxidase		-	
Produção de CO ₂ a partir glicose	-	↓	
Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	↓		↓
CK		↓ (HT e Cit)	
TBA			↑
TRAP			↓
Hidrólise de nucleotídeos (sinaptossomas de hipocampo)	↓ (ATP,ADP,AMP)		↓ (ATP,ADP,AMP)
Hidrólise de nucleotídeos (soro)	-	↓ (ATP,ADP,AMP)	

2. Utilização de antioxidantes e L-NAME sobre as alterações causadas pela arginina em alguns parâmetros bioquímicos.

	PRÉ- TRATAMENTO (VIT. E e C)	L-NAME
Captação de glicose	preveniu	
Liberação de lactato	preveniu	
SDH	preveniu	
Complexo II	preveniu	
Produção de CO ₂ a partir glicose		preveniu
Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	preveniu	preveniu
CK	preveniu	preveniu
TBA	preveniu	preveniu
TRAP	preveniu	-----
Hidrólise de nucleotídeos (soro)		preveniu

VI. PERSPECTIVAS

- 1) Investigar o efeito da administração intracerebroventricular de arginina sobre a memória espacial e a memória de trabalho no labirinto aquático de Morris.
- 2) Investigar o efeito do tratamento com os antioxidantes, vitaminas E e C e L-NAME sobre a performance cognitiva de ratos submetidos à administração intracerebroventricular de arginina através da memória espacial e memória de trabalho no labirinto aquático de Morris.
- 3) Investigar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de arginina sobre a captação do glutamato em fatias de hipocampo de ratos.
- 4) Verificar o efeito da administração intracerebroventricular de arginina sobre a captação do glutamato em fatias de hipocampo de ratos.
- 5) Verificar a influência do pré-tratamento com vitaminas E e C e do L-NAME sobre o efeito causado pela administração intracerebroventricular de arginina na captação de glutamato em fatias de hipocampo de ratos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aksenov, M., Aksenova, M.V., Butterfield, A.D., Markesbery, W.R. (2000). Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer's disease brain. *J. Neurochem.* 74: 2520-2527.
- Anderson, D.K.F., Waters, T.R., Means, E.D. (1988). Pretreatment with α -tocopherol enhances neurologic recovery after experimental spinal cord compression injury. *J. Neurotrauma* 5: 61-67.
- Antunes, A., Boveris, A., Cadenas, E. (2004). On the mechanism and biology of cytochrome oxidase inhibition by nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 16774-16779.
- Arstall, M.A, Bailey, C., Gross, W.L., Bak, M., Balligand, J.L., Kelly, R.A. (1998). Reversible S-nitrosation of creatine kinase by nitric oxide in adult rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30: 979-988.
- Avrova, N.F., Shestak, K.I., Zakharova, I.O., Sokolova, T.V., Leont'ev, V.G. (1999). The difference in the effect of glutamate and NO synthase inhibitor on free calcium concentration and Na^+ , K^+ -ATPase activity in synaptosomes from various brain regions. *Neurochem. Res.* 24: 1101-1106.
- Babcock, G.T., Wikström, M. (1992). Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* 356: 301-309.
- Batshaw, M.L., Thomas, G.H., Brusilow, S.W. (1981). New approaches to the diagnosis and treatment of inborn errors of the urea synthesis. *Pediatrics.* 68: 290-297.
- Beckman, J.S., Carson, M., Smith, C.D., Koppenol, W.H. (1993). ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* 364: 584.
- Benson, P.F., Fensom, A.H. (1985). *Genetic Biochemical Disorders*, Oxford: Oxford University Press, pp. 692.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2004a). Biossíntese de aminoácidos. Em: *Bioquímica*. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 5ª edição, cap. 24, pp.689-716.

- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2004b). Glicólise e Gliconeogênese. Em: Bioquímica. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 5ª edição, cap. 16, pp.443-482.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2004c). Fosforilação Oxidativa. Em: Bioquímica. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 5ª edição, cap. 18, pp.509-545.
- Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z., Ferencik, M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 65: 1865-1874.
- Bickel, H. (1987). Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. *Enzyme* 38: 14-26.
- Bigonnesse, F., Levesque, S.A., Kukulski, F., Lecka, J., Robson, S.C., Fernandes, M.J.G., Seigny, J. (2004). Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry* 43: 5511-5519.
- Blanco, G., Mercer, R.W. (1998). Isozymes of the Na-K-ATPase: Heterogeneity in structure, diversity and function. *Am. J. Physiol.* 275: F633-F650.
- Blouin, J.S., Bard, C., Paillard, J. (2004). Contribution of the cerebellum to self-initiated synchronized movements: a PET study. *Exp. Brain Res.* 155: 63-68.
- Blum, H., Balschi, J.A., Johnson, R.G. (1991). Coupled *in vivo* activity of creatine phosphokinase and the membrane-bound (Na⁺, K⁺)-ATPase in the resting and stimulated electric organ of the electric fish *Narcise brasiliensis*. *J. Biol. Chem.* 266: 10254-10259.
- Braun, N., Fengler, S., Ebeling, C., Servos, J., Zimmermann, H. (2000). Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase 6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. *Biochem. J.* 351(3):347-369.
- Brown, G.C., Cooper, C.E. (1994). Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* 356: 295-298.
- Brundege, J.M., Dunwiddie, T.V. (1997). Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Adv. Pharmacol.* 39: 353-391.

- Brunelli, M., Garcia, G.M., Mozzachiodi, R., Scuri, R., Zaccardi, M.L. (1997). Neurobiological principles of learning and memory. *Arch. Ital. Biol.* 135: 15-36.
- Bruno, A.N., Bonan, C.D., Wofchuk, S.T., Sarkis, J.J.F., Battastini, A.M.O. (2002). ATP diphosphohydrolase (NTPDase 1) in rat hippocampal slices and effect of glutamate on the enzyme activity in different phases of development. *Life Sci.* 71: 215-225.
- Brusilow, S.W., Horwich, A.L. (2001). Urea Cycle Enzymes. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, New York: McGraw-Hill, 8th ed., pp. 1909-1963.
- Buchmann, I., Milakofsky, L., Harris, N., Hofford, J.M., Vogel, W.H. (1996). Effect of arginine administration on plasma and brain levels of arginine and various related amino compounds in the rat. *Pharmacology* 53 : 133-142.
- Buettner, G.R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 300: 535-543.
- Burbaeva, G.S.H., Aksenova, M.V., Bibikova, V.I. (1987). BB creatine phosphokinase activity and content of the brain structures in senile dementia and Alzheimer's diseases. *Zh. Nevropatol. Psikhiatr. Im. S. S. Korsakova.* 87: 1374-1378.
- Burbaeva, G.S.H., Kalinenko, O.O., Aksenova, M.B. (1990). Decreased level of immunoreactive creatine phosphokinase BB isoenzymes in the brain of patients with schizophrenia and senile dementia of the Alzheimer type. *Zh. Nevropatol. Psikhiatr. Im. S. S. Korsakova.* 90: 85-87.
- Burklen, T.S., Schlattner, U., Homayouni, R., Gough, K., Rak, M., Szeghalmi, A., Wallimann, T. (2006). The creatine Kinase/creatine connection to Alzheimer's disease: CK-inactivation, APP-CK complexes and focal creatine deposits. *J. Biomed Biotechnol.* 3: 35936.
- Burnstock, G., Williams, M. (2000). P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295: 862-869.

- Burton, G.W., Wronska, U., Stone, L., Foster, D.O., Ingold, K.U. (1990). Biokinetics of dietary RRR- α -tocopherol in the male guinea-pig at three dietary levels of vitamin C and two levels of vitamin E. *Lipids* 25: 199-210.
- Butterfield, D.A., Stadtman, E.R. (1997). Protein oxidation processes in aging brain. *Adv. Cell. Aging Gerontol.* 2: 161–191.
- Carr, A., Frei, B. (1999). Does Vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.* 13: 1007–1024.
- Cassarino, D.S., Bennett Jr., J.P. (1999). An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res.* 29: 1-25.
- Cataldo, A.M., Broadwell, R.D. (1986). Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphate activity under normal and experimental conditions. I. Neurons and glia. *J. Electron. Microsc. Techn.* 3: 413-437.
- Cederbaum, S.D., Shaw, K.N.F., Valente, M. (1977). Hyperargininemia. *J. Pediatr.* 90: 569-573.
- Cederbaum, S.D., Shaw, K.N.F., Spector, E.B., Verity, M.A., Snodgrass, P.J., Sugarman, G.I. (1979). Hyperargininemia with arginase deficiency. *Pediatr. Res.* 13: 827-833.
- Cederbaum, S.D., Moedjono, S.J., Shaw, K.N., Carter, M., Naylor, E., Walzer, M. (1982). Treatment of hyperargininaemia due to arginase deficiency with a chemically defined diet. *J. Inherit. Metab. Dis.* 5 (2): 95-99.
- Chinta, S.J., Andersen, J.K. (2006). Reversible inhibition of mitochondrial complex I activity following chronic dopaminergic glutathione depletion in vitro: implications for Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 41: 1442-1448.
- Choi DW (1990). Methods for antagonizing glutamate neurotoxicity, *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 2: 105–147.
- Chvatchko, Y., Valera, S., Aubry, J.P., Renno, T., Buell, G., Bonnefoy, J.Y. (1996). The involvement of an ATP-gated ion channel, P2X1, in thymocyte apoptosis. *Immunity* 5: 275-283.

- Colombo, J.P. (1992). Argininemia: clinical and biochemical aspects. In: De Deyn, P.P., Marescau, B., Satlon, V., Quershi, I.A. eds. Guanidino Compounds in Biology & Medicine, John Libbery & Company Ltd., pp. 343-348.
- Cornelio, A.R., Rodrigues, V.Jr., Wyse, A.T.S., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., Wannmacher, C.M.D. (2004). Tryptophan reduces creatine kinase activity in the brain cortex of rats. *Int. J. Devl. Neurosci.* 22: 95-101.
- Costabeber, E., Kessler, A., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T.S., Wajner, M., Wannmacher, C.M.D. (2003). Hyperphenylalaninemia reduces creatine kinase activity in the cerebral cortex of rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 21: 111-116.
- Darley-Usmar, V., Wiseman, H., Halliwell, B. (1995). Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Letters.* 369:131-135.
- Davey, G.P., Clark, J.B. (1996). Threshold effects and control of oxidative phosphorylation in nonsynaptic rat brain mitochondria. *J. Neurochem.* 66: 1617-1624.
- David, S.S., Shoemaker, M., Haley, B.E. (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.
- Dawson, V.L., Dawson, T.M. (1996). Pathologic roles of nitric oxide in the central nervous system. *Free Radicals in Brain Physiology and Disorders* 83-100.
- Debaere, F., Wenderoth, N., Sunaert, S., Van Hecke, P., Swinnen, S.P. (2004). Cerebellar and premotor function in bimanual coordination: parametric neural responses to spatiotemporal complexity and cycling frequency. *Neuroimage* 21: 1416-1427.
- De Deyn, P.P., Marescau, B., Qureshi, I.A., Cederbaum, S.D., Lambert, M., Cerone, R., Chamoles, N., Spécóla, N., Leonard, J.V., Gatti, R., Green, R., Kang, S.S., Mizutani, N., Rezvani, I., Snyderman, S.E., Terheggen, H.G., Yoshino, M., Appel, B., Martin, Roth, J.J., Beudet, A .L., Vilarinho, L., Hirrsch, E., Jakobs, K., van Der Knaap, M.S., Naito, H ., Pickut, B.A ., Shapira, S.K ., Fuchshuber, A., Roth, B. , Hylan, K. (1997). Hyperargininemia: a treatable inborn error of metabolism? In: De

- Deyn, P.P., Marescau, I.A., Qureshi, S.D., Mori, A. eds. Guanidino Compounds in Biology and Medicine, Guildford, U.K.: John Libbery & Co., Vol. 2, pp. 53-69.
- Defalco, A.J., Davies, R.K. (1961). The synthesis of creatine by the brain of the intact rat. *J. Neurochem.* 7: 308-312.
- Delwing, D., Delwing, D., Wannamacher, C.M.D., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T.S. (2002). Arginine administration reduces catalase activity in midbrain of rats. *NeuroReport* 13: 1301-1304.
- Delwing, D., Tagliari, B., Streck, E.L., Wannamacher, C.M.D., Wajner, M., Wyse, A.T.S. (2003). Reduction of energy metabolism in rat hippocampus by arginine administration. *Brain Res.* 983: 58-63
- Devlin, T.M. (2003). Membranas biológicas: estrutura e transporte em membranas. In: Manual de bioquímica com correlações clínicas. Estados Unidos da América: editora Edgard Blücher LTDA. Tradução da 5ª edição americana. 462-463.
- Di Donato, S. (2000). Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. *J. Inherit. Metab. Dis.* 23: 247-263.
- Di Virgilio, F. (2000). Dr. Jekyll/Mr. Hyde: the dual role of extracellular ATP. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81: 59-63.
- Dubnoff, H., Borsook, H. (1941). A micromethod for the determination of glycocyanine in biological fluids and tissues. *J. Biol. Chem.* 138: 381.
- Dunwiddie, T.W., Diao, L., Proctor, W.R. (1997). Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J. Neurosci.* 17: 7673-7682.
- Dunwiddie, T.V., Masino, S.A. (2001). The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 31-55.
- Erecinska, M., Silver, I.A. (1994). Ions and energy in mammalian brain. *Progress in Neurobiology* 43: 37-71.
- Erecinska, M., Cherian, S., Silver, I.A. (2004). Energy metabolism in mammalian brain during development. *Prog. Neurobiol.* 73: 397-445.
- Evans, P., Halliwell, B. (2001). Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br. J. Nutr.* 85 (suppl 2): S67.

- Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Susino, M., Collo, G., Buell, G., Di Virgilio, F. (1997). ATP- mediated cytotoxicity in microglial cells. *Neuropharmacology* 36: 1295-1301.
- Ferrari, D., Los, M., Bauer, M.K.A., Vandenabeele, P., Wesselborg, S., Schulze-Osthoff, K. (1999). P2Z purinoceptors ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Lett.* 447: 71-75.
- Fleck, R.M.M., Rodrigues, V.Jr., Giacomazzi, J., Parissoto, D., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T.S., Wajner, M., Wannmacher, C.M.D. (2005). Cysteamine prevents and reverses the inhibition of creatine kinase activity caused by cystine in rat brain cortex. *Neurochem. Int.* 46: 391-397.
- Floyd, R.A. (1999). Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222: 236-245.
- Frei, B., Stocker, R., England, L., Ames, B.N. (1990). Ascorbate: the most effective antioxidant in the blood. *Adv. Exp. Med. Biol.* 264: 155-163.
- Geering, K. (1990). Subunit Assembly and Functional Maturation of Na,K-ATPase. *J. Membr. Biol.* 115: 109-121.
- Gotoh, T., Araki, M., Mori, M. (1997). Chromosomal localization of the human arginase II gene and tissue distribution of its mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233: 487-491.
- Grant, S.K., Green, B.G., Stiffey-Wilusz, J., Durette, P.L., Shah, S.K., Kozarich, J.W. (1998). Structural requirements for human inducible nitric oxide synthase substrates and substrate analogue inhibitors. *Biochemistry* 37: 4174-4180.
- Grisar, T. (1984). Glial and neuronal Na⁺-K⁺ pump in epilepsy. *Ann. Neurol.* 16: S128-S134.
- Gross, W.L., Bak, M.I., Ingwall, J.S., Arstall, M.A., Smith, T.W., Balligand, J.L., Kelly, R. (1996). Nitric oxide inhibits creatine kinase and regulates heart contractile reserve. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 5604-5609.
- Guimbal, C., Kilimann, M.F. (1993). Na⁺-dependent creatine transporter in rabbit brain, muscle, heart and kidney. *J. Biol. Chem.* 268: 8418-8421.

- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *J. Biochem.* 219: 1-14.
- Halliwell, B. (1996). Free radicals, protein and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 1023-1027.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2000). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press Inc. New York, 3rd ed.
- Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging.* 18: 685-716.
- Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J.Pharmacol.* 142:231-255.
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.* 97: 1634-31658.
- Hara, H., Kato, H., Kogure, K. (1990). Protective effect of α -tocopherol on ischemic neuronal damage in the gerbil hippocampus. *Brain Res.* 510: 335-338.
- Hattori, N., Kitagawa, K., Higashida, T., Yagyu, K., Shimohama, S., Wataya, T., Perry, G., Smith, M.A., Inagaki, C. (1998). Cl^- -ATPase and Na^+/K^+ -ATPase activities in Alzheimer's disease brains. *Neurosci. Lett.* 254: 141-144.
- Hawkins, R.A., Miller, A.L., Cremer, J.E., Veech, R.L. (1974). Measurement of the rate of glucose utilization by rat brain in vivo. *J. Neurochem.* 23: 917-923.
- Henry, Y., Guissani, A. (1999). Interactions of nitric oxide with hemoproteins: role of nitric oxide in mitochondria. *Life Sci.* 55: 1003-1014.
- Iyer, R., Jenkinson, C.P., Vockley, J.G., Kern, R.M., Grody, W.W., Cederbaum, S.D. (1998). The human arginases and arginase deficiency. *J. Inher. Metab. Dis.* 21(1): 86-100.
- Jenkinson, C.P., Grody, W.W., Cederbaum, S.D. (1996). Comparative properties of arginases. *Comp. Biochem. Physiol.* 114B: 107-132.

- Jorgensen, P.L., Hakansson, K.O., Karlish, S.J.D. (2003). Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu. Rev. Physiol.* 65: 817-849.
- Kaczmarek, E., Koziak, K., Sévigny, J., Siergel, J.B., Anrather, J., Beaudoin, A.R., Bach, F.H., Robson, S.C. (1996). Identification and characterization of CD39 vascular ATP diphosphohydrolase *J. Biol. Chem.* 271: 33116-33122.
- Kaplan, J.H. (2002). Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* 71:511-535.
- Kawashima, Y., Nagasawa, T., Ninomiya, H. (2000). Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. *Blood* 96: 2157-2162.
- Kessler, A., Costabeber, E., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T.S., Wajner, M., Wannmacher, C.M.D. (2003). Proline reduces creatine kinase activity in the brain cortex of rats. *Neurochem. Res.* 28: 1175-1180.
- Konorev, E., Hogg, N., Kalyanaraman, B. (1998). Rapid and irreversible inhibition of creatine kinase by peroxynitrite. *FEBS Lett.* 427: 171-174.
- Kurella, E.G., Tyulina, O.V., Boldyrev, A.A. (1999). Oxidative resistance of Na⁺/K⁺-ATPase. *Cell. Mol. Neurobiol.* 19:133-140.
- Kuzhikandathil, E.V., Molloy, G.R. (1994). Transcription of the brain creatine kinase gene in glial cells is modulated by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Neurosci. Res.* 39: 70-72.
- Latini, S., Pedata, F. (2001). Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J. Neurochem.* 79: 463-484.
- Law, A., Gauthier, S., Quirion, R. (2001). Say NO to Alzheimer's disease: the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type. *Brain Res.* 35: 73-96.
- Lees, G.J. (1993). Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. *Neuroscience* 54: 287-322.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (2007). *Lehninger Princípios de Bioquímica.* , São Paulo, Sarvier, 4^a ed.

- Lenaz, G. (2001). The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life* 52 (3-5):159-164.
- Liguri, G., Taddei, N., Nassi, P., Latorraca, S., Nediani, C., Sorbi, S. (1990). Changes in Na⁺,K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase and some soluble enzymes related to energy metabolism in brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 112: 338-342.
- Lincoln, J., Hoyle, C.H.V., Burnstock, G. (1997). Nitric oxide in health and disease. *Biochemical Research Topics*, Cambridge: Cambridge University Press, pp. 3-11.
- Lingrel, J.B., Kuntzweiler, T. (1994). Na⁺,K⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 269: 19659-19662.
- Lipton, S.A., Choi, Y.B., Pan, Z.H., Lei, S.Z., Chen, H.S.V., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J., Stamler, J.S. (1993). A redox based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso compounds. *Nature* 364 : 626-632.
- Lohse, M.J., Forstermann, U., Schmidt, H.H.H.W. (1998). Pharmacology of NO: cGMP signal transduction. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 358: 111-112.
- Lund-Andersen H (1979). Transport of glucose from blood to brain. *Physiol. Rev.* 59: 305-352.
- Marescau, B., Lowenthal, A., Terheggen, H.G., Esmans, E., Alderweireldt, F. (1982). Guanidino compounds in hiperargininemia. In: Lowenthal, A., Mori, A., Marescau, B. eds. *Urea Cycle Diseases- Adv. Exper. Med. Biology.* 153: 427-435.
- Marescau, B., De Deyn, P.P., Lowenthal, A., Qureshi, I.A., Antonozzi, I., Backmann, C., Cederbaum, S.D., Cerone, N., Chamoles, N., Colombo, J.P., Hyland, K., Gatti, R., Kang, S.S., Letarte, L., Lambert, M., Minutani, N., Possemiers, I., Rezvani, I., Snyderman, S.E., Terheggen, H.G., Yoshino, M. (1990). Guanidino compounds analysis as a complementary diagnostic parameter for hyperargininemia: follow-up of guanidine compounds levels during therapy. *Pediatr. Res.* 27(3): 297-303.
- Marescau, B., De Deyn, P.P., Qureshi, I.A., Antonozzi, I., Bachmann, C., Cederbaum, S.D. et al. (1992). Guanidino compounds in hyperargininemia. In: De Deyn, P.P., Marescau, B., Satlon, V., Qureshi, I.A. eds. *Guanidino Compounds in Biology & Medicine.*, John Libbey & Company Ltd., pp. 363-371.

- Marshall, J.M. (2000). Adenosine and muscle vasodilatation in acute systemic hypoxia. *Acta Physiol. Scand.* 168: 561-573.
- McCord, J.M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* 108: 652.
- Mekhfi, H., Veksler, V., Mateo, P.H., Maupoil, V., Rochette, L., Ventura-Clapier, R. (1996). Creatine kinase in the main target of reactive oxygen species in cardiac myofibrils. *Circ. Res.* 17: 1016-1027.
- Mizutani, N., Maehara, M., Hayakawa, C., Kato, T., Watanabe, K., Suzuki, S. (1983). Hyperargininemia: clinical course and treatment with sodium and phenylacetic acid. *Brain Dev.* 5: 555-563.
- Mizutani, N., Hayakawa, C., Ohya, Y., Watanabe, K., Watanabe, Y., Mori, A. (1987). Guanidino compounds in hyperargininemia. *Tohoku J. Exp. Med.* 153: 197-205.
- Moncada, S., Higgs, A. (1993). The L-arginine pathway. *N. Engl. J. Med.* 329: 2002-2012.
- Mori, M., Gotoh, T., Nagasaki, A., Takiguchi, M., Sonoki, T. (1998). Regulation of the urea cycle enzyme genes in nitric oxide synthesis. *J. Inher. Metab. Dis.* 21 (1): 59-71.
- Msall, M., Batshaw, M.L., Suss, R., Brusilow, S.W., Mellits, E.D. (1984). Neurologic outcome in children with inborn errors of urea synthesis. *New Engl. J. Med.* 1500-1505.
- Mulero, J.J., Yeung, G., Nelken, S.T., Ford, J.E. (1999). CD39-L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates. *J. Chem.* 274: 20064-20067.
- Natelson, S., Sherwin, J.E. (1979). Proposed mechanisms for urea nitrogen reutilization : relationship between urea and proposed guanidine cycles. *Clin. Chem.* 25: 1343-1344.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. (2000). *Lehninger. Principles of Biochemistry*, New York: Worth Publishers, 3rd ed.
- Nelson, E.J., Connolly, J., McArthur, P. (2003). Nitric oxide and S-nitrosylation: excitotoxic and cell signaling mechanism. *Biol. Cell.* 95: 3-8.

- Oliveira, E.M., Battastini, A.M.O., Meirelles, M.N.L., Moreira, C.M., Dias, R.D., Sarkis, J.J.F. (1997). Characterization and localization of Na⁺ ATP diphosphohydrolase activity in sarcolemmal membrane from rat heart. *Mol. Cel. Biochem.* 170: 115-123.
- Onyango, I.G., Khan, S.M. (2006). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and stress signaling in Alzheimer disease. *Curr. Alzheimer Res.* 3: 339–349.
- Oses, J.P., Cardoso, C.M., Germano, R.A., Kirst, I.B., Rücker, B., Fürstenau, C.R., Winck, M.R., Bonan, C.D., Battastini, A.M.O., Sarkis, J.J.F. (2004). Soluble NTPDase: an additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Life Sci.* 74: 3275–3284.
- Pilla, C., Cardoso, R.F.O., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T.S., Wajner, M., Wannmacher, C.M.D. (2003). Effect of leucine administration on creatine kinase activity in rat brain. *Metab. Brain Dis.* 18: 17-25.
- Pisano, J.A., Underfriend, S. (1963). Biosynthesis and disposition of γ -guanidinobutyric acid in mammalian tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 100: 323.
- Prast, H., Philippu, A. (2001). Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol.* 64: 51-68.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman, B.A. (1991). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. *J. Biol. Chem.* 266: 4244-4250.
- Radi, R., Cassina, A., Hodara, R. (2002). Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol. Chem.* 383: 401-409.
- Reis, E.A., Oliveira, L.S., Lamers, M.L., Netto, C.A. and Wyse, A.T.S. (2002). Arginine administration inhibits hippocampal Na⁺,K⁺-ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. *Brain Res.* 951 (2): 151-157.
- Renkawek, K., Renier, W.O., De Pont, J.J., Vogels, O.J., Gabreels, F.J. (1992). Neonatal status convulsivus, spongiform encephalopathy, and low activity of Na⁺/K⁺-ATPase in the brain. *Epilepsia* 33: 58-64.
- Reznick, A.Z., Packer, L. (1993). Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. In: Poli, G., Albano, E., Dianzani, M.U. eds.

- Free Radicals: From Basic Science to Medicine, Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 425-437.
- Robson, S.C., Sévigny, J., Zimmermann, H. (2006). The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure, function, relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*. 2: 409-430.
- Roth, G.S., Joseph, J.A., Mason, R.P. (1995). Membrane alterations as causes of impaired signal transduction in Alzheimer's disease and aging. *Trends Neurosci*. 18: 203-206.
- Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M., Freeman, B.A. (1994). Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J. Biol. Chem*. 269: 26066-26075.
- Salvador, M., Henriques, J.A.P. (2004). Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. 1ª edição. Canoas, RS: editora da Ulbra.
- Saraste, M. (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283: 1488-1492.
- Sarti, P., Lendaro, E., Ippoliti, R., Benedetti, P.A., and Brunori, M. (1999). Modulation of mitochondrial respiration by nitric oxide: investigation by single cell fluorescence microscopy. *FASEB J*. 13: 191-197.
- Sato, T., Kamata, Y., Irifune, M., and Nishikawa, T. (1995). Inhibition of purified (Na⁺,K⁺)-ATPase activity from porcine cerebral cortex by NO generating drugs. *Brain Res*. 704: 117-120.
- Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., VALLE, D. eds. (2001). The metabolic and molecular bases of inherited disease, McGraw –Hill, Inc., New York, 8th ed.
- Sharpe, M.A., Cooper, C.E. (1998). Interactions of peroxynitrite with mitochondrial cytochrome oxidase. Catalytic production of nitric oxide and irreversible inhibition of enzyme activity. *J. Biol. Chem*. 273: 30961-30972.
- Shi, J.D., Kukar, T., Wang, C.Y., Li, Q.Z., Cruz, P.E., Davoodisemiromi, A., Yang, P., Gu, Y., Lian, W., Wu, D.H., She, J.X. (2001). Molecular cloning and

- characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1). *J. Biol. Chem.* 276: 17474-17478.
- Siesjo, B.K. (1978). In: *Brain energy metabolism*, Wiley, New York.
- Silva, C.G., Parolo, E., Streck, E.L., Wajner, M., Wannmacher, C.M.D., Wyse, A.T.S. (1999). In vitro inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity from rat cerebral cortex by guanidine compounds accumulating in hyperargininemia. *Brain Res.* 838: 78-84.
- Skou, J.C., Esmann, M. (1992). The Na⁺,K⁺-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24: 249-261.
- Smith, C., Marks, A.D., Lieberman, M. (2005). *Mark's Basic Medical Biochemistry*. Baltimore, Ed. Lippincott Williams Wilkins, 2 ed.
- Smith, T.M., Kirley, T.L. (1998). sequencing and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases. *Biochim. Biophys. Acta* 386: 65-78.
- Snyderman, S.E., Sansaricq, C., Chen, W.J., Norton, P.M., Phansalkar, S.V. (1977). Argininemia. *J. Pediatr.* 90: 563-568.
- Snyderman, S.E., Sansaricq, C., Norton, P.M., Goldstein, F. (1979). Argininemia treated from birth. *J. Pediatr.* 95 (1): 61-63.
- Squire, L.R. (2004). Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory* 82: 171-177.
- Stachowiak, O., Dolder, M., Wallimann, T., Richter, C. (1998). Mitochondrial creatine kinase is prime target of peroxynitrite-induced modification and inactivation. *J. Biol. Chem.* 273: 16694-16699.
- Therien, A.G., Goldshleger, R., Karlish, S.J., Blostein, R. (1997). Tissue-specific distribution and modulatory role of the γ subunit if the Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 272: 32628-32634.
- Tinton, S.A., Lefebvre, V.H., Cousin, O.C., Buc-Calderon, P.M. (1993). Cytolytic effects and biochemical changes induced by extracellular ATP to isolated hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1176: 1-6.

- Tomimoto, H., Yamamoto, K., Homburger, H.A., Yanagihara, T. (1993). Immunoelectron microscopic investigation of creatine kinase BB-isoenzyme after cerebral ischemia in gerbils. *Acta Neuropathol.* 86: 447-455.
- Vasilets, L.A., Schwarz, W. (1993). Structure-function relationships of cation binding in the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1154:201-222.
- Vatassery, G.T. (1998). Vitamin E and other endogenous antioxidants in the central nervous system. *Geriatrics* 53 (Suppl 1): S25-S27.
- Vatassery, G.T., DeMaster, E.G., Lai, J.C.K., Smith, W.E., Quach, H.T. (2004). Iron uncouples oxidative phosphorylation in brain mitochondria isolated from vitamin E-deficient rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1688: 265-273.
- Voet, D., Voet, J.G. (2006). *Bioquímica*. Porto Alegre, Artmed, 3 ed.
- Wallace, D.C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283: 1482-1487.
- Wallimann, T., Walzthony, D., Wegmann, G., Moser, H., Eppenberger, H.M., Barrantes, F.J. (1985). Subcellular localization of creatine kinase in Torpedo electrocytes: Association with acetylcholine receptor-rich membranes *J. Cell. Biol.* 100: 1063-1072.
- 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., 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.
- Wang, X.Q., Xiao, A.Y., Sheline, C., Hyrc, K., Yang, A., Goldberg, M.P., Choi, D.W., and Yu, S.P. (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.

- Wendt, S., Dedeoglu, A., Speer, O., Wallimann, T., Beal, M.F., Andreassen, O.A. (2002). Reduced creatine kinase activity in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Free Radic. Biol. Med.* 32: 920-926.
- Wolosker, H., Panizzutti, R., Englender, S. (1996). Inhibition of creatine kinase with S-nitrosoglutathione. *FEBS Lett.* 392: 274-276.
- Wyse, A.T.S., Streck, E.L., Worm, P., Wajner, A., Ritter, F., Netto, C.A. (2000). Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem. Res.* 25: 969-973.
- Wyse, A.T.S., Bavaresco, C.S., Bandinelli, C., Streck, E.L., Franzon, R., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M. (2001). Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME prevents the decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity in midbrain of rats subjected to arginine administration. *Neurochem. Res.* 26: 515-520.
- Wyse, A.T.S., Stefanello, F.M., Chiarani, F., Delwing, D., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M. (2004). Arginine administration decreases cerebral cortex acetylcholinesterase and serum butyrylcholinesterase probably by oxidative stress induction. *Neurochem. Res.* 29: 385-389.
- Yousef, M.I., El-Hendy, H.A., El-Demesdash, F.M., Elagamy, E.I. (2002). Dietary zinc deficiency induced-changes in the activity of enzymes and the level of free radicals, lipids and protein electrophoretic behavior in growing rats. *Toxicology* 175: 223–234.
- Yu, S.P. (2003). Na⁺,K⁺-ATPase: The new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. *Biochem. Pharmacol.* 66: 1601–1609.
- Yuan, G., Kaneko, M., Masuda, H., Hon, R.G., Kobayashi, A., Yamazaki, N. (1992). Decrease in heart mitochondrial creatine kinase activity due to oxygen free radical. *Biochim. Biophys. Acta* 1140: 78-84.
- Zilles, K., Qu, M., Schleicher, A., Schroeter, M., Kramer, M., Witte, O.W. (1995). Plasticity and neurotransmitter receptor changes in Alzheimer's disease and experimental cortical infarcts. *Arzneim-Forsch* 45: 361-366.
- Zimmermann, H. (1996). Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 49: 589-618.

- Zimmermann, H. (2001). Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res.* 52: 44-56.
- Zimmermann, H. (2006). Ectonucleotidases in the nervous system. *Novartis Found Symp.* 276: 113-128.