

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**PAPEL NEUROPROTETOR DAS VITAMINAS E e C SOBRE ALTERAÇÕES
BIOQUÍMICAS E COMPORTAMENTAIS EM RATOS SUBMETIDOS AO
MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERPROLINEMIA TIPO II**

DANIELA DELWING DE LIMA

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 e ao meu marido pela
compreensão, apoio e amor.**

**“A vida me ensinou a nunca desistir,
nem ganhar, nem perder,
mas procurar evoluir”
(Dias de luta, dias de glória-
Charlie Brawn Jr.)**

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora e amiga Profa. Dra. Angela T. S. Wyse pela oportunidade, presença constante, ensinamentos, paciência, profissionalismo, compreensão e carinho com que orientou este trabalho.

Aos Profs. Clóvis M. D. Wannmacher, Moacir Wajner e Carlos Severo Dutra-Filho pelos ensinamentos e amizade.

Aos bolsistas e colegas alunos de pós-graduação: Débora, Fábria, Caren, Francieli, Siomara, Cristiane Matté, Andréa Kurek, Cristiane Mattos, Emilene, Alexandra e Emílio, Bárbara, Vanize, Janaina, Thiago, Juliana, Virginia e Renan pelo companheirismo, apoio, trabalhos em conjunto e amizade.

Aos meus pais, Ciro e Dalila, por me incentivarem sempre, pelo carinho, pelos ensinamentos e por acreditarem sempre em meus sonhos.

Ao meu marido Nicássio por estar sempre presente, pelo carinho e principalmente pela compreensão.

À minha irmã Débora por estar ao meu lado em mais um passo de minha vida, pelo companheirismo, incentivo constante e amor.

Ao meu irmão Fábio pelo apoio constante, carinho, amor e pela sua participação na realização deste sonho.

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

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pela possibilidade de realizar este trabalho de pesquisa.

Ao CNPq, CAPES, FAPERGS, PROPESQ e UFRGS.

A Deus, pela saúde, força e pela oportunidade de viver.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A hiperprolinemia tipo II é uma doença autossômica recessiva causada pela deficiência severa na atividade da enzima Δ^1 -pirrolino-5-carboxilato desidrogenase, o que resulta em acúmulo tecidual de prolina. Muitos pacientes afetados por essa doença apresentam epilepsia e retardo mental. Embora as manifestações neurológicas sejam encontradas em um considerável número de pacientes hiperprolinêmicos, os mecanismos pelos quais essas ocorrem são pouco compreendidos.

Considerando que pouco se sabe a respeito dos altos níveis de prolina no cérebro, os objetivos do nosso estudo foram investigar os efeitos *in vivo* (agudo e crônico) e *in vitro* da prolina sobre alguns parâmetros bioquímicos (atividades da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase em córtex cerebral e soro de ratos, respectivamente, citocromo c oxidase e Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral de ratos; captação do glutamato em fatias de córtex cerebral e hipocampo de ratos e hidrólise de nucleotídeos em sinaptossomas obtido de córtex cerebral e em soro de ratos). Também investigamos o efeito do pré-tratamento com as vitaminas E e C ou da administração concomitante desses antioxidantes durante a administração crônica de prolina sobre as alterações causadas pela prolina nos parâmetros de estresse oxidativo, nas atividades da acetilcolinesterase, citocromo c oxidase e Na^+, K^+ -ATPase, na captação do glutamato e no déficit de memória espacial. Em adição, também investigamos o efeito da administração aguda de vitamina E, vitamina C, L-NAME e melatonina sobre a alteração causada pela prolina na atividade da

acetilcolinesterase, a fim de verificar se esses antioxidantes e o L-NAME seriam capazes de prevenir tal efeito.

Os resultados mostraram que a administração aguda de prolina reduziu a atividade da acetilcolinesterase e aumentou a atividade da butirilcolinesterase em homogeneizado e soro de ratos, respectivamente. Verificamos também que a administração aguda e crônica de prolina reduziu a atividade da citocromo c oxidase em córtex cerebral de ratos e que a administração aguda de prolina reduziu a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral de ratos. Além disso, também observamos que a prolina *in vitro* reduziu a captação do glutamato em córtex cerebral e hipocampo e que a prolina *in vivo* reduziu a captação do glutamato somente em córtex cerebral. Os efeitos relatados possivelmente ocorreram pela geração de radicais livres, visto que antioxidantes importantes como as vitaminas E e C preveniram esses efeitos, exceto a redução da captação do glutamato. Tais antioxidantes também preveniram o déficit de memória e as alterações de vários parâmetros de estresse oxidativo causados pela prolina, como o aumento da quimiluminescência, a redução do potencial antioxidante total não-enzimático (TRAP) e as alterações nas atividades das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSH-Px). Cabe ressaltar que a administração aguda de vitamina E, vitamina C, L-NAME e melatonina também preveniu a ação da prolina causada sobre a acetilcolinesterase. Verificamos também que a administração aguda e crônica de prolina alterou a hidrólise de nucleotídeos adenínicos em sinaptossomas de córtex cerebral e em soro de ratos. Nossos resultados, em conjunto, mostram que a hiperprolinemia tipo II causa uma série de alterações neuroquímicas, as quais podem

contribuir para as disfunções neurológicas características da doença. Além disso, se esses resultados também ocorrerem em humanos, nossos dados referentes à utilização de antioxidantes (vitaminas E e C) poderão ser usados como uma estratégia para o tratamento de alguns sintomas associados com a hiperprolinemia tipo II.

ABSTRACT

Hyperprolinemia type II is an autosomal recessive disorder caused by the severe deficiency of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase activity, resulting mainly in tissue accumulation of proline. Most patients detected so far show epilepsy and mental retardation. Although neurological dysfunction is commonly found in a considerable number of hyperprolinemic patients, the mechanisms by which this occurs are poorly understood.

Considering that very little is known about the role of high sustained levels of proline in brain, the general objective of the present study was to investigate the *in vivo* (acute and chronic) and *in vitro* effects of proline on some biochemical parameters (activities of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in cerebral cortex and serum of rats, respectively, cytochrome c oxidase and Na^+, K^+ -ATPase in cerebral cortex of rats; glutamate uptake in cerebral cortex and hippocampus slices of rats and nucleotide hydrolysis in synaptosomes from cerebral cortex of rats and in serum of rats). We also investigated the effect of pretreatment with antioxidants (vitamins E and C) or concomitant administration of these antioxidants during chronic proline treatment on the effects elicited by proline on some parameters of oxidative stress, on the activities of acetylcholinesterase, cytochrome c oxidase and Na^+, K^+ -ATPase, on glutamate uptake and on the deficit of spatial memory. In addition, we also evaluated the influence of acute administration of vitamin E, vitamin C, L-NAME and melatonin on the effects elicited by proline on acetylcholinesterase activity, with the propose to verify if these antioxidants and L-NAME will be able to prevent such effect.

The results showed that acute administration of proline reduced acetylcholinesterase activity and increased butyrylcholinesterase activity in homogenate of cerebral cortex and serum of rats, respectively. We also verified that acute and chronic administration of proline reduced the activity of cytochrome c oxidase in cerebral cortex of rats and that acute administration of proline reduced the activity of Na⁺,K⁺-ATPase in cerebral cortex of rats. In addition, proline *in vitro* reduced glutamate uptake in cerebral cortex and hippocampus slices of rats and proline *in vivo* reduced glutamate uptake just in cerebral cortex. The effects related here possibly occurred by the generation of free radicals, since important antioxidants such as vitamins E and C prevented these effects, except the reduction on glutamate uptake. The memory deficit and the alterations on various parameters of oxidative stress caused by proline [increase of chemiluminescence, reduction of total radical-trapping parameter (TRAP) and alterations on the activities of antioxidants enzymes catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px)] were also prevented by these antioxidants. Acute administration of vitamin E, vitamin C, L-NAME and melatonin also prevented the reduction caused by proline on acetylcholinesterase activity. Besides, we also showed that acute and chronic administration of proline altered the adenine nucleotide hydrolysis in synaptosomes from cerebral cortex of rats and in serum of rats. Our group's results show that hyperprolinemia type II causes various neurochemical alterations, which may contribute to the neurological dysfunction characteristic of this disease. Furthermore, 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 hyperprolinemia type II.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	01
1.1 Erros Inatos do Metabolismo	01
1.2 L-Prolina	02
1.3 Hiperprolinemias	04
1.3.1 Hiperprolinemia Tipo II	05
1.4 Modelo animal de hiperprolinemia tipo II	08
1.5 Radicais Livres e Estresse Oxidativo	09
1.6 Vitaminas E e C	11
1.7 Colinesterases: Acetilcolinesterase e butirilcolinesterase	12
1.8 Glutamato	14
1.9 Cadeia Respiratória Mitocondrial	17
1.10 Na⁺,K⁺-ATPase	19
1.11 NTPDase e ecto-5'-nucleotidase	22
1.12 Memória	24
II. OBJETIVOS	27
Objetivo Geral.....	27
Objetivos específicos.....	28
Capítulo I	28
Capítulo II.....	29
Capítulo III	30
Capítulo IV.....	31

Capítulo V	32
Capítulo VI.....	33
Capítulo VII.....	34
III. RESULTADOS E METODOLOGIAS.....	35
Capítulo I	35
Capítulo II.....	42
Capítulo III	47
Capítulo IV.....	54
Capítulo V	82
Capítulo VI.....	89
Capítulo VII.....	96
IV. DISCUSSÃO.....	102
V. CONCLUSÕES.....	122
VI. PERSPECTIVAS.....	128
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura da prolina (Berg et al., 2004).....	02
FIGURA 2. Rota metabólica de biossíntese da prolina (Berg et al., 2004).....	03
FIGURA 3. Rota metabólica de degradação da prolina (Berg et al., 2004).....	04
FIGURA 4. Rota metabólica da prolina, indicando o local de bloqueio na hiperprolinemia tipo II(Adaptado de Phang et al., 2001).....	06
FIGURA 5. Estresse oxidativo x mecanismos de defesa (Adaptado de Smith et al., 2005).....	10
FIGURA 6. Neurotransmissão colinérgica.....	12
FIGURA 7. Captação do glutamato.....	16
FIGURA 8. Fluxo de elétrons através da cadeia respiratória (Adaptado de Smith et al., 2005).....	18
FIGURA 9. Estrutura da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase (Adaptado de Voet et al., 2006).....	20
FIGURA 10. Operação dos sistemas de memória (Lent, 2002).....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE: acetilcolinesterase
ADP: adenosina 5'-difosfato
AMP: adenosina 5'-monofosfato
AMPc: adenosina monofosfato cíclico
AMPA: (RS)- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato
ATP: adenosina 5'-trifosfato
BuChE: butirilcolinesterase
CR: cadeia respiratória
CAT: catalase
COX: citocromo c oxidase
DNA: ácido desoxirribonucléico
EIM: erros inatos do metabolismo
EAO: espécies ativas de oxigênio
FADH₂ : flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
GSH-Px: glutationa peroxidase
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
L-NAME: N^o-nitro-L-arginine methyl ester
NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NMDA: N-metil-D-aspartato
NOS: óxido nítrico sintase
P5C: pirrolino-5-carboxilato
SNC: sistema nervoso central
SN: sistema nervoso
SOD: superóxido dismutase
TRAP: potencial antioxidante total não-enzimático

I. INTRODUÇÃO

1.1 Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são doenças hereditárias que se manifestam pela síntese de uma proteína anômala, geralmente uma enzima, ou por uma diminuição ou mesmo ausência de sua síntese. Essas 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 (Bickel, 1987). O termo “erro inato do metabolismo” foi sugerido por Sir Archibald Garrod em 1908 e atualmente, ele é usado para descrever mais de 500 defeitos (Scriver et al., 2001).

Os EIM são, de maneira geral, distúrbios graves que se manifestam na infância cujo diagnóstico pode ser dificultado devido ao grande número de alterações, diversidade de defeitos metabólicos e ausência, na maioria dos casos, de sinais e sintomas específicos. O diagnóstico dos EIM deve ser realizado o mais logo após o nascimento, a fim de possibilitar ao indivíduo um tratamento específico e imediato (Giugliani, 1988).

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

e proteínas plasmáticas. Esse trabalho enfoca um EIM de aminoácidos denominado hiperprolinemia tipo II.

1.2 L-Prolina

De acordo com Berg e colaboradores (2004d), a L-prolina (prolina) é classificada como um aminoácido de cadeia lateral alifática, possuindo um grupo pirrolidina cíclico na cadeia lateral. A prolina difere dos outros aminoácidos por ter sua cadeia lateral ligada ao átomo de carbono α e ao nitrogênio do arcabouço. Esse aminoácido influencia pronunciadamente a arquitetura das proteínas porque sua estrutura em anel faz com que tenha maior restrição de conformação do que os demais aminoácidos (Figura 1).

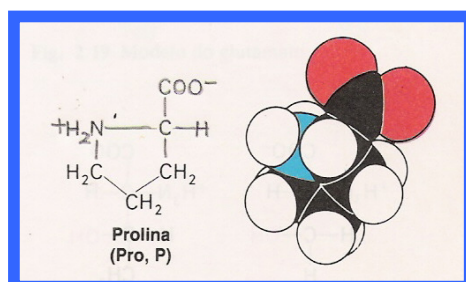


Figura 1. Estrutura da prolina (Berg et al., 2004).

A prolina é um aminoácido não essencial em crianças e adultos, e condicionalmente essencial em prematuros. A prolina, em sua rota metabólica, pode ser sintetizada a partir de ornitina e glutamato, tendo como intermediários comuns pirrolino-5-carboxilato (P5C) e glutamato- γ -semialdeído (Phang et al., 2001).

Para que o glutamato seja utilizado para a síntese de prolina, primeiro a carboxila γ do glutamato reage com o ATP, formando um acilfosfato que será

reduzido pelo NADPH a um aldeído, o γ -semialdeído glutâmico que se cicliza espontaneamente com a perda de água originando o Δ^1 -pirrolino-5-carboxilato, o qual será reduzido pelo NADPH por ação da enzima P5C redutase à prolina (Berg et al., 2004a). A redução do grupo γ -carboxil do glutamato a aldeído caracteriza-se por ser um processo endoergônico facilitado, primeiramente pela fosforilação do grupo carboxila em uma reação catalisada pela γ -glutamil-quinase (Smith et al., 2005; Voet e Voet, 2006). A enzima bifuncional, P5C sintase, é responsável pela conversão de glutamato a P5C. Essa enzima caracteriza-se por ser ATP e NADPH dependente, e também por possuir alta atividade na mucosa do intestino delgado e atividade mensurável no cólon, pâncreas, timo e cérebro. A enzima P5C redutase, que catalisa a conversão de P5C em prolina, tem como cofator NADH ou NADPH e é encontrada em todos os tecidos. Para que a ornitina seja utilizada para a síntese de prolina, a enzima ornitina- γ -aminotransferase catalisa a conversão de ornitina a P5C, utilizando o α -cetoglutarato, como acceptor amino (Phang et al., 2001, Flynn et al., 2002) (Figura 2).

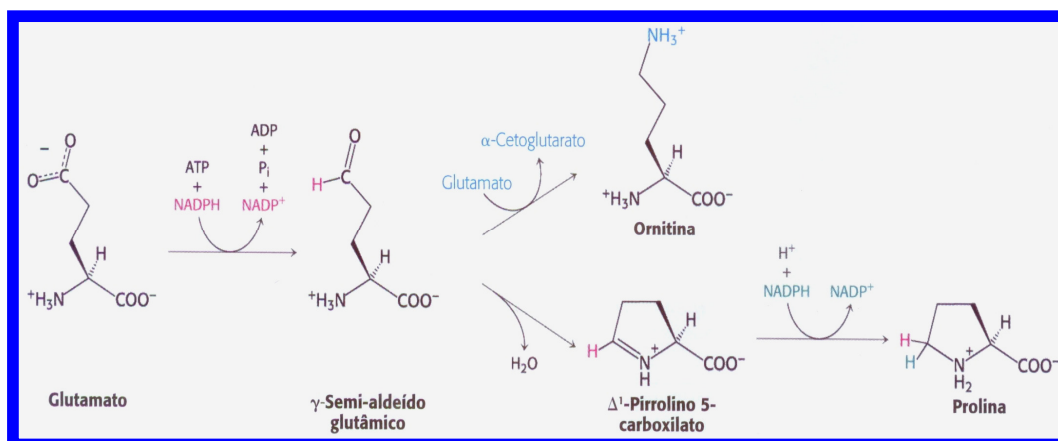


Figura 2. Rota metabólica de biossíntese da prolina (Berg et al., 2004).

A prolina oxidase, que se localiza no fígado, rim e cérebro, é a primeira enzima envolvida na degradação da prolina, dando origem ao P5C, que pode ser degradado a glutamato pela P5C desidrogenase. Essa enzima localiza-se na matriz mitocondrial (Phang et al., 2001) (Figura 3).

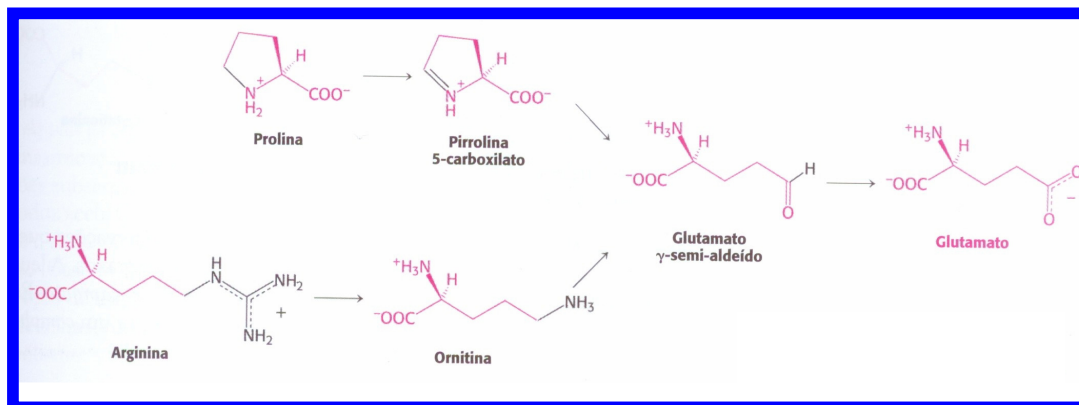


Figura 3. Rota metabólica de degradação da prolina (Berg et al., 2004).

A função metabólica das rotas da prolina é fornecer prolina para a síntese de proteínas, gliconeogênese hepática e síntese de ornitina e arginina, sendo o P5C um intermediário dessas rotas (Phang et al., 2001).

A concentração de prolina no plasma e no fluido cérebro-espinhal de indivíduos normais é de 50-270 μM e de 1-4 μM , respectivamente. Iminoglicinúria neonatal e prolinúria pós-natal são achados normais e ocorrem devido à imaturidade do sistema de reabsorção tubular de prolina (Phang et al., 1995).

1.3 Hiperprolinemias

Hiperprolinemias são EIM da prolina causados pela deficiência de enzimas envolvidas na sua rota de degradação, o que resulta no acúmulo tecidual de prolina. A degradação da prolina envolve sua conversão em P5C pela prolina oxidase e de

P5C a glutamato pela P5C desidrogenase. As hiperprolinemias caracterizam-se pela elevação anormal de prolina no plasma e no fluído cérebro-espinhal (Phang et al., 2001) e são classificadas em tipo I e II.

A hiperprolinemia tipo I é causada pela deficiência na atividade da enzima prolina oxidase, impossibilitando assim a oxidação de prolina a P5C (Efron, 1965; Phang et al., 2001). Estudos indicam que não existem relações causais entre a deficiência da prolina oxidase e manifestações clínicas (Phang et al., 2001).

A hiperprolinemia tipo II é causada pela deficiência na atividade da enzima Δ^1 -pirrolino-5-carboxilato-desidrogenase; enzima responsável pela conversão de P5C a glutamato (Phang et al., 2001).

Ambos os tipos de hiperprolinemia são caracterizados bioquimicamente pelo acúmulo tecidual de prolina. Todavia, os níveis de prolina no plasma dos pacientes com hiperprolinemia tipo II são mais elevados (Phang et al., 2001).

O presente trabalho deteve-se no estudo da hiperprolinemia tipo II, em face de sua associação com manifestações neurológicas e também a fim de dar continuidade aos nossos prévios trabalhos realizados sobre o referente tema.

1.3.1 Hiperprolinemia Tipo II

É uma doença autossômica recessiva do metabolismo de aminoácido causada pela deficiência hepática na atividade da enzima Δ^1 -pirrolino-5-carboxilato-desidrogenase, o que resulta no acúmulo tecidual de prolina (Phang et al., 2001) (Figura 4).

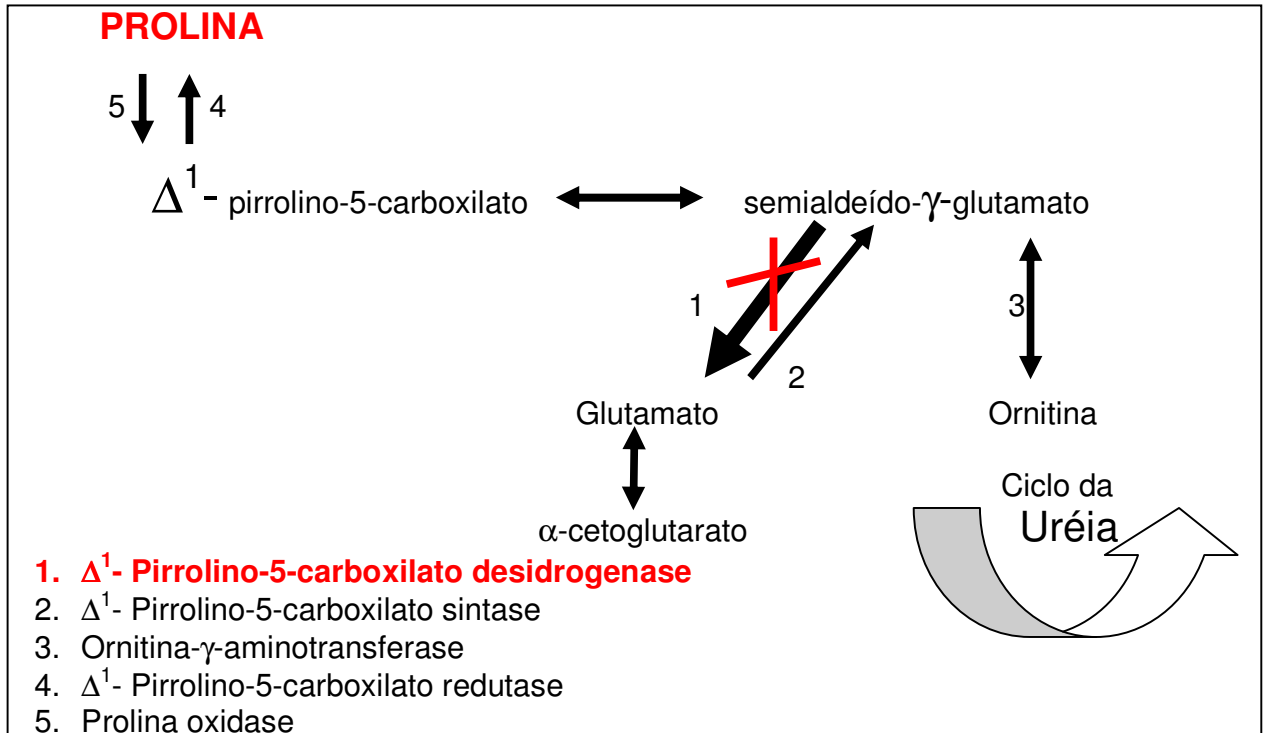


Figura 4. Rota metabólica da prolina, indicando o local de bloqueio na hiperprolinemia tipo II (Adaptado de Phang et al., 2001).

O diagnóstico da hiperprolinemia tipo II é baseado nos níveis aumentados de prolina sérica e no fluído cérebro-espinhal, os quais oscilam entre 500-3.700 μM (valores indivíduos normais: 50-270 μM) e 20-50 μM (valores indivíduos normais: 1-4 μM), respectivamente (Emery et al., 1968; Phang et al., 2001). Embora os níveis plasmáticos e urinários de P5C encontram-se de 10 a 40 vezes mais elevados do que os valores normais em indivíduos sadios (Phang et al., 2001) e os níveis de glutamato também estejam elevados no líquor (Van Harreveld e Fifková, 1973; Rhoads et al., 1983; Phang et al., 2001), o principal metabólito acumulado quantitativamente na hiperprolinemia tipo II é a prolina. A prolina é o único aminoácido com concentrações

plasmáticas anormais nos pacientes hiperprolinêmicos, enquanto que na urina ocorre aumento de prolina, hidroxiprolina e glicina (Phang et al., 2001).

Outro achado bioquímico consistente é a iminoglicinúria, que pode se estabelecer pela competição da prolina com outros aminoácidos que compartilham um sistema comum de transporte renal (Applegarth et al., 1974; Goodman et al., 1974). Quando os níveis de prolina plasmáticos excedem 800 μM , a iminoglicinúria presente nos pacientes torna-se diretamente proporcional à concentração de prolina plasmática. A iminoglicinúria ocorre devido ao fato de prolina, glicina e hidroxiprolina utilizarem o mesmo transportador; assim quando a prolina estiver em altas concentrações, o transporte dos outros substratos será inibido por competição. O excesso de prolina satura o mecanismo de transporte tubular, ocasionando a prolinúria (Phang et al., 2001).

A maioria dos pacientes com hiperprolinemia tipo II apresentam epilepsia e retardo mental, porém alguns são assintomáticos (Phang et al., 2001). Mesmo sendo tais manifestações encontradas em um considerável número de pacientes hiperprolinêmicos, os mecanismos pelos quais os sintomas ocorrem são pouco compreendidos (Fremeau et al., 1992).

Até o presente momento, parece não existir tratamento específico para as hiperprolinemias. Por outro lado, Benson e Fensom (1985) acreditam que existem variantes nas hiperprolinemias, e defendem a idéia de tentar reduzir os níveis de prolina nos indivíduos afetados. Porém, a prolina é um aminoácido não essencial, sintetizado a partir de outros precursores. Além disso, a maioria das proteínas contém resíduos de prolina, o que torna a restrição dietética desse aminoácido difícil,

resultando apenas em um modesto controle nos valores plasmáticos de prolina, o que não provoca impacto nas manifestações clínicas da doença (Phang et al., 2001).

1.4 Modelo animal de hiperprolinemia tipo II

O modelo animal de hiperprolinemia tipo II utilizado nesse trabalho foi o mesmo utilizado em outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa e baseia-se no modelo experimental desenvolvido por Moreira e colaboradores (1989).

No modelo químico experimental crônico de hiperprolinemia tipo II, os ratos são tratados do 6° ao 28° dia de vida, sendo a prolina administrada por via subcutânea, duas vezes ao dia e com intervalo de 10 horas entre as injeções. As doses de prolina variam conforme o peso e a idade dos ratos e foram determinadas de acordo com os parâmetros farmacocinéticos da prolina, com o objetivo de obter níveis plasmáticos similares àqueles encontrados em pacientes hiperprolinêmicos. Os ratos controles recebem igual volume de solução salina 0,9% (1ml/100g de peso corporal) (Moreira et al., 1989).

Dados na literatura mostram que a administração subcutânea ou intracerebral de prolina em ratos prejudica a formação da memória (Cherkin et al., 1976; Moreira et al., 1989), o que pode refletir os efeitos neurotóxicos da prolina e as conseqüências funcionais das alterações fisiopatológicas que ocorrem no cérebro desses animais (Olton e Markowska, 1994).

Estudos prévios realizados em nosso grupo de pesquisa mostraram que a administração de prolina diminui a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em cérebro de ratos

(Pontes et al., 1999; 2001), o que possivelmente leva ao rompimento do gradiente iônico e à excitotoxicidade (Lees, 1993).

1.5 Radicais Livres e Estresse Oxidativo

Os radicais livres são definidos como moléculas que possuem elétrons não pareados, o que os confere instabilidade e os tornam muito reativos (Gilbert, 2000). Em condições fisiológicas, todos os organismos geram níveis basais de radicais livres, cujo efeito pró-oxidante é balanceado pelas defesas antioxidantes, porém, em situações patológicas ocorre um aumento na formação de radicais livres e/ou uma diminuição nas defesas antioxidantes endógenas, promovendo o estresse oxidativo (Salvador e Henriques, 2004), o qual é definido como um desequilíbrio entre a formação de espécies reativas e as defesas antioxidantes (Freeman e Crapo, 1982; Halliwell e Whiteman, 2004). O estresse oxidativo pode causar dano em diferentes tipos de biomoléculas, incluindo o DNA, proteínas e lipídios (Halliwell e Gutteridge, 2000; Halliwell e Whiteman, 2004).

O organismo possui mecanismos de defesa contra a ação tóxica dos radicais livres e das espécies reativas, diminuindo ou eliminando as conseqüências negativas de seus efeitos no organismo. Esses mecanismos compreendem as defesas antioxidantes que são classificadas em enzimáticas e não-enzimáticas. As defesas antioxidantes enzimáticas incluem principalmente as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) e glutathione reductase (Halliwell, 2001; Salvador e Henriques, 2004) e as defesas antioxidantes não-enzimáticas incluem principalmente as vitaminas (A, C, E), a riboflavina, a tiamina, os

polifenóis, a glutathiona, a melatonina, a bilirrubina, os α -cetoácidos, o urato, o ácido lipóico e os estrógenos (Taysi et al., 2002; Yang et al., 2002; Salvador e Henriques, 2004) (Figura 5).

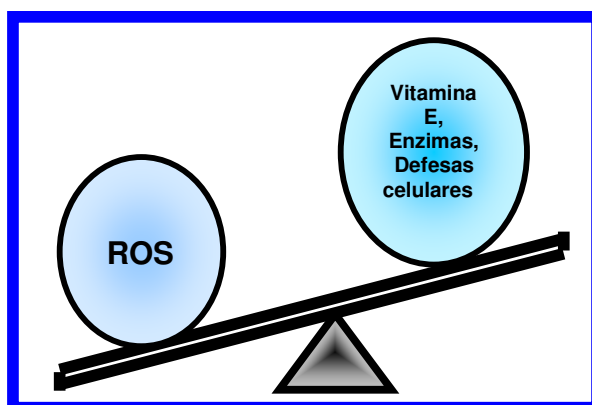


Figura 5. Estresse oxidativo x mecanismos de defesa (Adaptado de Smith et al., 2005).

O estresse oxidativo é um importante processo que vem sendo relacionado com a patogênese de algumas condições que afetam o sistema nervoso central (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 oxigênio; 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). Portanto, o equilíbrio entre a formação de radicais livres e a sua remoção é rompido em condições de estresse oxidativo (Butterfield et al., 1997).

Resultados obtidos em nosso laboratório mostraram que a hiperprolinemia tipo II induz o estresse oxidativo, uma vez que a administração da prolina (*in vivo* e *in vitro*) ocasionou o aumento na formação de radicais livres e a redução ou aumento das defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas (Delwing et al., 2003b,c).

1.6 Vitaminas E e C

A vitamina E (α -tocoferol) é uma molécula lipossolúvel intercalada no interior das membranas que tem sido considerada um antioxidante importante para o funcionamento cerebral em humanos (Vatassery, 1998). Estudos mostram que as propriedades antioxidantes da vitamina E podem prevenir doenças associadas ao estresse oxidativo como as desordens neurológicas (Brigelius-Flohe et al., 2002), uma vez que essa vitamina atua como um importante varredor de radical peróxil (ROO^\bullet) (Halliwell e Gutteridge, 2000). No cérebro, tem sido mostrado que a vitamina E possui papel protetor, pois é capaz de reduzir a degeneração de células hipocâmpais após isquemia cerebral (Hara et al., 1990). Corroborando com essa informação, estudos têm mostrado que a vitamina E é capaz de diminuir a progressão da doença de Alzheimer (Sano et al., 1997). Dados da literatura indicam que a suplementação de vitamina E aumenta os níveis de glutatona (GSH) e diminui a concentração de lipídios peroxidados em eritrócitos de humanos (Jain et al., 2000), pois a vitamina E possui a propriedade de finalizar a propagação de reações dos radicais livres nas membranas lipídicas (Marshall e Bangert, 1995).

A vitamina C (ácido L-ascórbico) é um antioxidante ativo contra radicais livres sendo um doador de elétrons, um agente redutor, capaz de prevenir a oxidação de

outros compostos. A vitamina C é considerada um varredor de radicais hidroxil e superóxidos (Halliwell e Gutteridge, 2000) e, juntamente com a vitamina E, possui papel importante na proteção de membranas contra o estresse oxidativo. A vitamina C regenera a vitamina E à sua forma reduzida doando elétrons ao radical α -tocoferil, prolongando dessa maneira, seu efeito antioxidante (Carr e Frei, 1999; Sener et al., 2005).

Estudos realizados em nosso grupo de pesquisa mostraram que o pré-tratamento com vitaminas E e C foi capaz de prevenir a redução da atividade da acetilcolinesterase (AChE) e da Na^+, K^+ -ATPase causada pela administração de prolina em cérebro de ratos (Delwing et al., 2003a, Franzon et al., 2003).

1.7 COLINESTERASES: Acetilcolinesterase e Butirilcolinesterase

A acetilcolina é um neurotransmissor sintetizado no citoplasma do terminal sináptico a partir de acetato e colina por ação da enzima colina-acetiltransferase. A atividade da acetilcolina é finalizada por colinesterases presentes na sinapse (Lent, 2002a; Massoulié, 2002) (Figura 6).

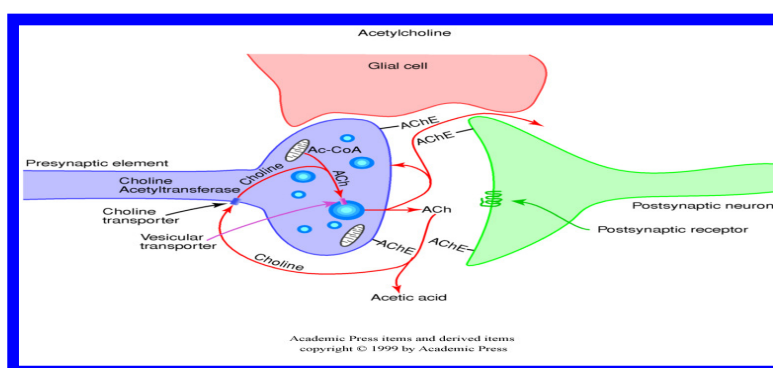


Figura 6. Neurotransmissão colinérgica.

Existem dois tipos de colinesterases, a AChE e a butirilcolinesterase (BuChE), cuja classificação é baseada na preferência por substratos. A AChE hidrolisa preferencialmente a acetilcolina enquanto que a BuChE hidrolisa a acetilcolina e outros ésteres de colina, incluindo a butirilcolina e a succinilcolina (Lockridge, 1988; Massoulié et al., 1993; Lane et al., 2005).

A AChE atua na transmissão colinérgica de mamíferos, estando presente em maior concentração no SNC, músculo esquelético e na membrana de eritrócitos (Inestrosa e Perelman, 1990, Massoulié et al., 1993; Darvesh et al., 2003; Aldunate et al., 2004). A inibição na atividade da enzima ocasiona o acúmulo de acetilcolina, o que pode causar convulsões e epilepsia (Olney et al., 1986). A BuChE, também conhecida por colinesterase não específica ou pseudocolinesterase, é uma enzima que está presente no soro, células hematopoiéticas, fígado, coração, endotélio vascular, sinapses colinérgicas e no SNC (Silver, 1974, Mack e Robitzki, 2000; Darvesh et al., 2003). Estudos recentes mostraram que essa enzima encontra-se também presente em estruturas com papel importante nas funções cognitivas, tais como: córtex cerebral, hipocampo, amígdala e tálamo (Darvesh et al., 2003).

Estudos realizados por Giacobini (2000) e Geula e Darvesh (2004) sugerem que a BuChE pode atuar como um co-regulador da atividade da acetilcolina no SNC, uma vez que a inibição dessa enzima aumenta, de maneira dose dependente, os níveis desse neurotransmissor no cérebro. Nesse contexto, Mesulam e colaboradores (2002) mostraram que na ausência da AChE, a BuChE parece substituí-la na manutenção da integridade estrutural e fisiológica do sistema colinérgico. Estudos realizados por Bowen e Dawson (1986) e Benzi e Moretti (1998) mostraram uma

diminuição na atividade da AChE e um aumento na atividade da BuChE em cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer. Assim, cabe ressaltar que a BuChE sérica tem sido considerada um marcador periférico do sistema colinérgico central (Fossi et al., 1992).

Pesquisas desenvolvidas por nosso grupo mostraram que a hiperprolinemia tipo II reduz a atividade da AChE em córtex cerebral de ratos e que as vitaminas E e C previnem tal efeito (Delwing et al., 2003a). Nossos resultados corroboram com dados da literatura que mostram que a atividade da AChE é reduzida por radicais livres e que esse efeito é prevenido por antioxidantes (Tsakiris et al., 2000).

1.8 Glutamato

O aminoácido L-glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório presente no SNC de mamíferos, participando de muitas funções cerebrais como cognição, memória, aprendizado (Fonnum, 1984; Meldrum, 2000; Danbolt, 2001; Myhrer, 2003; Lynch, 2004) e adaptação ao ambiente (Ozawa et al., 1998; Mattson et al., 2002; Warren, 2002). O glutamato exerce sua ação agindo em receptores glutamatérgicos localizados na superfície das células neurais. A proporção com que esses receptores são estimulados depende da concentração de glutamato no fluído extracelular (Ullensvang et al., 1997; Attwell, 2000; Danbolt, 2001; Chen e Swanson, 2003). Quando o glutamato está presente em altas concentrações na fenda sináptica, ele pode causar excitotoxicidade, resultante da superestimulação dos receptores glutamatérgicos, o que pode contribuir para o dano neuronal (Furuta et al., 1997;

Danbolt, 2001; Segovia et al., 2001; Maragakis e Rothstein, 2001, 2004; Mattson et al., 2002).

Os receptores glutamatérgicos são classificados como ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos foram subseqüentemente classificados de acordo com o agonista mais seletivo e subdivididos em NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato) e cainato. O receptor metabotrópico é referido simplesmente como metabotrópico cuja ação ocorre indiretamente através de proteínas G. Esses são subdivididos em três grupos. Os receptores do grupo I estão acoplados a proteínas G que ativam cascata de segundo mensageiro (fosfolipase C) promovendo a liberação de Ca^{++} de estoques intracelulares, enquanto que os receptores dos grupos II e III estão acoplados a proteínas G, inibindo a formação de AMPc (Mayat et al., 1995; Kurihara et al., 1997; Zhao et al., 1997; Hirai, 2000; Danbolt, 2001).

Uma vez que não existe uma enzima específica no meio extracelular capaz de metabolizar significativamente o glutamato (Rothstein et al., 1994; Ullensvang et al., 1997; Attwell, 2000; Danbolt, 2001; Chen e Swanson, 2003), a quantidade desse neurotransmissor presente na fenda sináptica depende do equilíbrio entre a sua liberação pelos neurônios pré-sinápticos e a sua captação que ocorre principalmente através de transportadores localizados na membrana celular dos astrócitos e também nos terminais neuronais pré-sinápticos. A literatura relata cinco diferentes isoformas de transportadores de glutamato, identificadas como GLAST (EAAT1) (Storck et al., 1992), GLT-1 (EAAT2) (Pines et al., 1992), EAAC1 (EAAT3) (Kanai e Hediger, 1992), EAAT4 (Fairman et al., 1995) e EAAT5 (Arriza et al., 1997). O transportador GLT-1 é

considerado o principal transportador de glutamato em todas as regiões cerebrais (Danbolt et al., 2001). Além disso, a captação do glutamato é dependente de sódio (Anderson e Swanson, 2000; Attwell, 2000; Danbolt, 2001; Chen e Swanson, 2003).

Após o glutamato ser liberado na fenda sináptica e exercer sua ação nos receptores glutamatérgicos, ele deve ser recaptado, com o objetivo de interromper a transmissão sináptica. Dessa maneira, o glutamato é transportado do fluido extracelular para o interior dos astrócitos onde é detoxificado convertendo-se em glutamina. Essa é liberada para o fluido extracelular e após é captada pelos neurônios glutamatérgicos, onde será convertida em glutamato que será armazenado em vesículas para posterior liberação. Essa rota, conhecida como ciclo da glutamina-glutamato, tem sido mencionada como a principal forma pela qual o neurotransmissor glutamato é captado (Danbolt, 2001) (Figura 7).

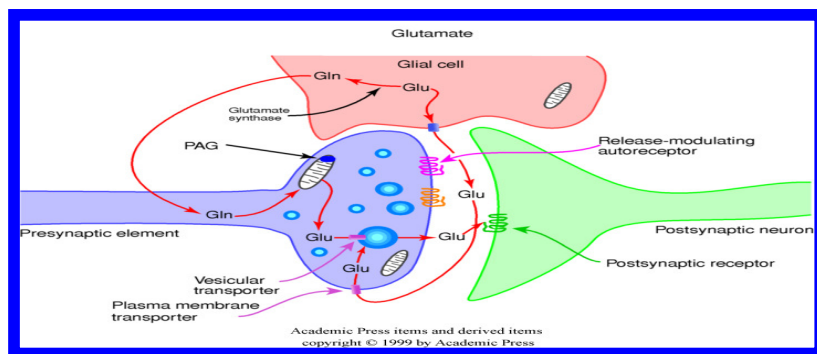


Figura 7. Captação do glutamato.

Estudos recentes mostram que em certas desordens neurodegenerativas do SNC, como na doença de Alzheimer e na doença de Huntington, ocorre um aumento nos níveis de glutamato no fluido extracelular, ocasionando dessa forma, a excitotoxicidade glutamatérgica (Brewer, 2000; Danbolt, 2001; Ingram et al., 2001;

Segovia et al., 2001; Maragakis e Rothstein, 2001, 2004; Campiani et al., 2003; Wenk, 2006).

1.9 Cadeia Respiratória Mitocondrial

A fosforilação oxidativa é o processo pelo qual se forma ATP quando se transfere elétrons do NADH e FADH₂ provenientes da glicólise, do ciclo do ácido cítrico e da oxidação de ácidos graxos para o oxigênio molecular, o acceptor final de elétrons na cadeia respiratória (CR), por uma série de transportadores de elétrons. Esse processo é considerado a principal fonte de ATP em organismos aeróbicos (Babcock e Wikström, 1992; Voet e Voet, 2006) e necessita da ação de complexos protéicos localizados em uma estrutura especial da membrana mitocondrial interna, a CR (Di Donato, 1997), a qual é formada pelos seguintes componentes: NADH:Q oxidorreductase (complexo I), succinato:Q oxidorreductase (complexo II), citocromo c oxidorreductase (complexo III) e citocromo c oxidase (complexo IV). Além desses complexos, a CR possui dois transportadores móveis de elétrons, que são a coenzima Q (CoQ), entre os complexos I e III, e o citocromo c, entre os complexos III e IV (Berg al., 2004b; Lehninger et al., 2007) (Figura 8).

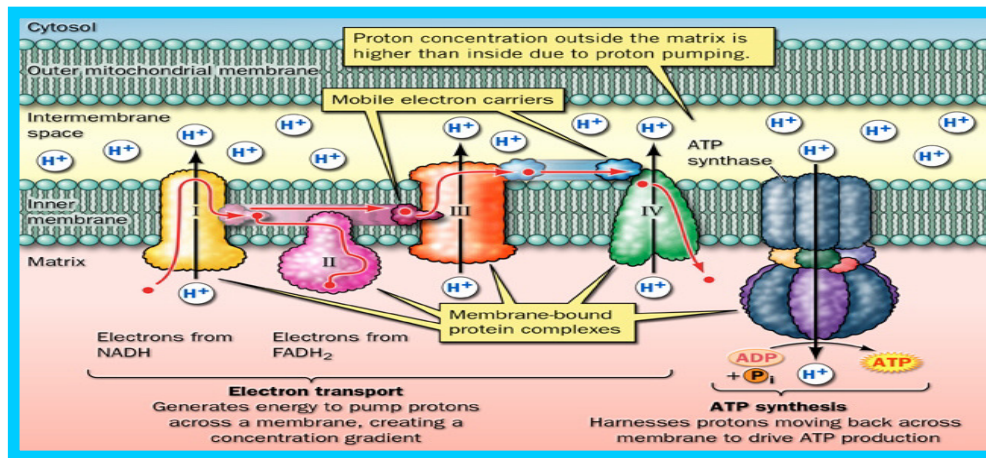


Figura 8. Fluxo de elétrons através da cadeia respiratória (Adaptado de Smith et al., 2005).

A citocromo c oxidase (COX), o último complexo da CR, é composta de doze ou mais subunidades polipeptídicas (Barrientos et al, 2002; Berg et al., 2004b). As três maiores subunidades formam o centro catalítico da enzima. A subunidade I contém os grupamentos heme (citocromos a e a_3) e um dos íons Cu (Cu_B) enquanto que a subunidade II contém um centro de Cu binuclear (Cu_A) (Capaldi, 1992). A subunidade III não apresenta grupamento prostético e não parece estar envolvida no bombeamento de prótons, mas na manutenção da estabilidade estrutural (Barrientos et al, 2002). Esse complexo possui a função de transferir elétrons do citocromo c para o oxigênio, uma vez que catalisa a oxidação do citocromo c^{2+} a citocromo c^{3+} e a redução do oxigênio molecular à água, acoplado à transferência de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana. Nessa reação, cada molécula de oxigênio precisa receber quatro elétrons para ser reduzida a $2 H_2O$, o que é facilitado pela presença de íons Cu^{2+} na COX (Babcock e Wikstrom, 1992; Smith et al., 2005). A COX é considerada a enzima chave na regulação da síntese de ATP mitocondrial,

uma vez que a reação redox entre o citocromo c e o oxigênio é essencialmente irreversível (Poyton e McEwen, 1996).

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). Durante o metabolismo aeróbio, espécies ativas de oxigênio (EAO), tais como o superóxido e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são produzidas em níveis fisiológicos (Boveris e Cadenas, 1982; Forman e Boveris, 1982). Esses metabólitos são removidos do organismo por reações enzimáticas e não-enzimáticas (Wu et al., 1999). Porém, inibição do complexo IV (COX) ou de outro complexo da CR pode conduzir à redução incompleta do oxigênio, e conseqüentemente, ao aumento da formação de radicas livres e redução da síntese de ATP (Bose et al., 1992; Milatovic et al., 2001; Gupta et al., 2002). Nesse cenário, níveis elevados de radicais livres podem causar dano aos componentes mitocondriais e iniciar processos degradativos (Cadenas e Davies, 2000).

1.10 Na^+,K^+ -ATPase

A Na^+,K^+ -ATPase é uma proteína integral de membrana (Hansen e Clausen, 1988) responsável pela manutenção do gradiente iônico neuronal através do co-transporte de três íons Na^+ para o meio extracelular e dois íons K^+ para o meio intracelular. Para realizar o transporte desses íons, a enzima utiliza energia proveniente da hidrólise de cerca de 50% do ATP produzido no cérebro (Erecinska e Silver, 1994; Erecinska et al., 2004). A manutenção do equilíbrio eletrolítico intra e extracelular garante ao neurônio a geração do potencial de membrana e do gradiente

eletroquímico a fim de manter a excitabilidade, o volume neuronal e a transmissão de sinais neurais por todo o sistema nervoso (SN) (Kaplan, 2002; Devlin, 2003).

Quanto à estrutura, a Na^+, K^+ -ATPase é composta por duas subunidades α transmembranas, que contém os sítios de ligação para Na^+ , K^+ , ATP e glicosídios cardíacos, duas subunidades β regulatórias, na forma de glicoproteínas, e uma subunidade δ (Blanco et al., 2000; Kaplan, 2002; Devlin, 2003; Erecinska et al., 2004) (Figura 9).

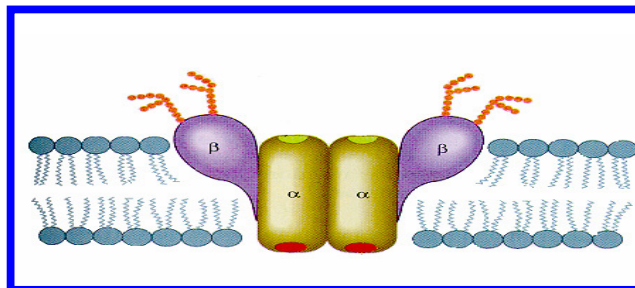


Figura 9. Estrutura da Na^+, K^+ -ATPase (Adaptado de Voet e Voet, 2006).

Durante o ciclo catalítico a subunidade α é fosforilada e desfosforilada em um resíduo de ácido aspártico, estabilizando a estrutura em duas formas, E_1 e E_2 (Vasilets e Schwarz, 1993; Kaplan, 2002; Devlin, 2003; Jorgensen et al., 2003). Na conformação E_1 , os sítios fixadores de íons têm alta afinidade para o Na^+ , dessa forma ocorre a ligação de três íons Na^+ que são transportados para o meio extracelular como resultado da fosforilação da proteína e da transição para o estado E_2 . Na conformação E_2 , os sítios fixadores de íons têm alta afinidade para o K^+ , ligando assim dois íons K^+ , o que provoca a desfosforilação da enzima e o transporte de dois íons K^+ para o meio intracelular. A enzima desprovida de uma fosforila não é

estável na forma E2, e volta à forma E1 que tem alta afinidade por Na⁺, completando o ciclo (Kaplan, 2002; Devlin, 2003; Jorgensen et al., 2003; Berg et al., 2004c).

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).

Trabalhos realizados em nosso grupo de pesquisa mostraram que a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase está reduzida em hipocampo e córtex cerebral (Pontes et al., 1999; 2001) de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperprolinemia tipo II. Nossos resultados também mostraram que as vitaminas E e C e a glutatona foram capazes de prevenir o efeito mediado pela prolina em hipocampo de ratos, indicando a participação do estresse oxidativo na inibição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase nessa estrutura cerebral (Franzon et al., 2003). Nossos resultados corroboram com a literatura, uma vez que um dos mecanismos envolvido na redução da atividade dessa enzima é o estresse oxidativo, pois a Na⁺,K⁺-ATPase é inibida por radicais livres (Yousef et al., 2002). Possivelmente essa inibição é causada por oxidação dos grupos sulfidril presentes no sítio ativo da enzima (Dobrota et al., 1999; Kurella et al., 1999). A enzima também pode ser inibida por produtos de lipoperoxidação e por alterações na fluidez da membrana plasmática (Morel et al., 1999; Rauchová et al., 1999; Chakraborty et al., 2003).

1.11 NTPDases e ecto-5'-nucleotidase

Os trifosfo- e difosfo-nucleosídeos podem ter seus níveis extracelulares controlados pela ação de várias enzimas que estão localizadas na superfície celular ou estão na forma solúvel. Nos últimos anos, consideráveis progressos têm sido feitos na caracterização de uma família de enzimas responsáveis pela degradação de nucleotídeos extracelulares, conhecida como família E-NTPDases. As E-NTPDases hidrolisam nucleotídeos purínicos e pirimídicos, tri- e difosfatados na dependência de cátions divalentes, como Ca^{2+} e /ou Mg^{2+} (Zimmermann, 2001, 2006).

Em geral, as NTPDases possuem seu sítio ativo voltado para o meio extracelular ou para o lúmen de organelas intracelulares como o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático. Porém, existem também formas solúveis da enzima (Zimmermann, 1996; Bigonnesse et al., 2004).

Até o momento, oito membros da família das NTPDases têm sido identificadas, as quais se diferenciam pelas variações quanto à afinidade pelo substrato, que pode ser revelada pela razão de hidrólise dos nucleotídeos. As NTPDases 1, 2, 3 e 8 possuem dois domínios transmembrana e o sítio ativo voltado para o meio extracelular (Zimmermann, 2001; Bigonnesse et al., 2004). A NTPDase 1 (CD39, ecto-apirase, ecto-ATP difosfohidrolase) hidrolisa ATP e ADP igualmente bem, sendo a proporção de hidrólise de 1:1 (Kaczmarek et al., 1996; Wang e Guidotti, 1996; Zimmermann, 2001; Zimmermann, 2006). A NTPDase 2 (CD39L1 ou ecto-ATPase) tem uma preferência maior pela hidrólise do ATP do que do ADP, sendo a proporção de hidrólise de 30:1, agindo como um produtor extracelular de ADP. A NTPDase 3 (CD39L3) apresenta propriedades funcionais intermediárias e hidrolisa o ATP em

uma velocidade aproximadamente três vezes maior que o ADP (Smith e Kirley, 1998; Mateo et al., 1999; Zimmermann, 2001; Zimmermann, 2006) enquanto que a NTPDase 8, que também é um intermediário funcional, hidrolisa ATP com cerca de duas vezes mais eficiência que o ADP (Bigonesse et al., 2004).

Já as NTPDases 4, 5, 6 e 7 são ancoradas em membranas de organelas intracelulares por um ou dois domínios transmembrana e apresentam o sítio catalítico voltado para o lúmen das organelas (Biederbick et al., 2000; 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).

As ecto-5'-nucleotidases constituem uma família de enzimas com distribuição tecidual ampla, existindo formas solúveis e formas ancoradas à membrana. De acordo com a localização celular e propriedades bioquímicas, essa família de enzimas classifica-se em quatro grupos: uma ecto-5'-nucleotidase ancorada a membrana plasmática, uma forma solúvel, e duas formas citoplasmáticas. Assim, a atividade catalítica da ecto-5'-nucleotidase controla os níveis extra e intracelulares de AMP e de outros nucleosídeos monofosforilados (Kawashima et al., 2000; Robson et al., 2006). Portanto, a associação dessas enzimas (NTPDase e ecto-5'-nucleotidase)

produz uma via altamente eficiente, desenvolvida com o objetivo de controlar os níveis extracelulares de ATP e de adenosina.

Cabe ressaltar que o ATP é o principal nucleotídeo de adenina liberado nos terminais nervosos de diferentes áreas cerebrais (Fiedler et al., 1992; Burnstock, 1999). Em relação ao sistema cardiovascular, os nucleosídeos de adenina mono-, di- e trifosfatados modulam eventos fisiológicos de crescimento celular (Erlinge, 1998), contração/dilatação dos vasos, agregação plaquetária e a transmissão sináptica (Ralevic e Burnstock, 2003). A adenosina também apresenta muitas funções importantes, sendo considerada uma substância neuromoduladora e neuroprotetora em muitas áreas cerebrais (Dunwiddie e Masino, 2001; Latini e Pedata, 2001). Essa molécula pode promover a vasodilatação (Marshall, 2000), inibir a agregação plaquetária (Kawashima et al., 2000) e ativar enzimas do sistema antioxidante, apresentando dessa forma, um eficiente mecanismo de proteção aos danos causados pelos radicais livres (Maggirwar et al., 1994).

1.12 Memória

A capacidade de aprender e recordar eventos depende de modificações induzidas no SN pela percepção desses eventos. O aprendizado consiste na aquisição de novas informações ou novos conhecimentos através da experiência, enquanto que a memória consiste na capacidade de armazenar e evocar informações (Izquierdo, 1988; Squire et al., 1993; Bear et al., 2002).

A operação dos sistemas de memória pode ser representada por uma seqüência de etapas, as quais têm início com a aquisição, que consiste na entrada de um

evento qualquer nos sistemas neurais ligados à memória. Após ocorre o processo de retenção da memória, que consiste no armazenamento dos aspectos selecionados de um evento, os quais serão armazenados por um período de tempo que poderá variar de segundos a anos. Portanto, dentre os vários aspectos de um evento, alguns serão esquecidos imediatamente, outros memorizados por certo período e apenas uns poucos permanecerão na memória por um tempo prolongado. Nesse último caso, diz-se que ocorreu a consolidação. Por fim, o último dos processos é a evocação, através da qual temos acesso à informação armazenada (Izquierdo, 1989; Quillfeldt, 1994; McGaugh, 1996; 2000; Lent, 2002b) (Figura 10).

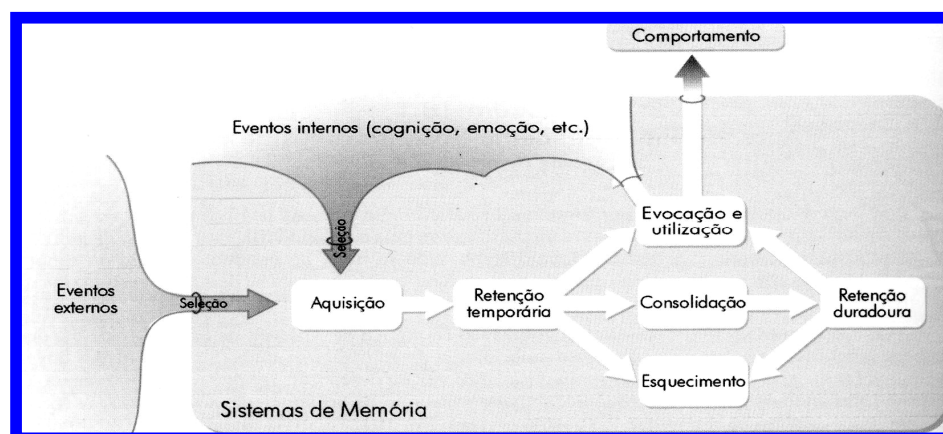


Figura 10. Operação dos sistemas de memória (Lent, 2002).

Atualmente, várias técnicas são utilizadas em laboratórios de pesquisa com o objetivo de avaliar a memória em animais. Uma dessas técnicas compreende a tarefa do labirinto aquático de Morris, um teste já utilizado há 20 anos atrás como um modelo experimental para investigar o aprendizado e a memória espacial em animais, sendo considerada uma tarefa adequada para avaliar a cognição em ratos. Estudos

mostraram que o aprendizado espacial em geral parece depender da ação coordenada de diferentes regiões cerebrais e dos sistemas de neurotransmissão (D'Hooge e De Deyn, 2001). Corroborando com esses dados, estudos também demonstraram que lesões em diferentes regiões cerebrais como no hipocampo, estriado, cerebelo e em determinadas áreas corticais, parecem prejudicar a tarefa do labirinto aquático de Morris (Roof et al., 1993; Liu e Bilkey, 1998).

O estresse oxidativo é um processo que vem sendo relacionado aos mecanismos patofisiológicos envolvidos no dano cerebral observado em muitas doenças neurodegenerativas como o Parkinson, Alzheimer e Huntington (Matés et al., 1999). A redução do estresse oxidativo e a concomitante diminuição das EAO têm efeitos benéficos no aprendizado e na memória. Nesse contexto, estudos mostram que o tratamento crônico com antioxidantes melhora a performance cognitiva em modelos animais de Parkinson (Dunnett e Björklund, 1999) e Alzheimer (Praticò e Delanty, 2000) e estudos em ratos idosos mostram que o déficit no aprendizado motor pode ser melhorado com dietas ricas em antioxidantes como o β -caroteno e as vitaminas E e C (Bickford et al., 2000).

Recentemente, estudos realizados em nosso grupo de pesquisa mostraram que ratos submetidos à administração crônica de prolina apresentam déficit na memória espacial (Bavaresco et al., 2005), sugerindo que altos níveis de prolina no período de desenvolvimento (6° ao 28° dia) podem causar dano neurológico na fase adulta dos ratos (60 dias).

II. OBJETIVOS

Objetivo geral

Considerando que: (1) a prolina induz o estresse oxidativo, (2) reduz as atividades das enzimas Na^+, K^+ -ATPase e AChE em cérebro de ratos, (3) prejudica a memória em ratos, (4) provoca alterações no estado redox da célula, resultando na diminuição do consumo de oxigênio e da oxidação do NADH, (5) ativa receptores NMDA e pode potencializar a ação do glutamato (6) e que pacientes com hiperprolinemia tipo II apresentam disfunção neurológica, o **objetivo geral** do presente estudo foi investigar o efeito da prolina sobre alguns parâmetros bioquímicos em ratos (atividades da AChE e BuChE em córtex cerebral e soro de ratos, respectivamente, atividades das enzimas citocromo c oxidase e Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral de ratos, captação do glutamato em córtex cerebral e hipocampo de ratos, hidrólise de nucleotídeos em sinaptossomas obtidos de córtex cerebral e em soro de ratos). Também investigamos o efeito das vitaminas E e C sobre as alterações bioquímicas e comportamentais em ratos submetidos à hiperprolinemia tipo II.

Este trabalho será dividido em sete capítulos como segue:

Capítulo I

Objetivos específicos

1. Investigar a influência do pré-tratamento com α -tocoferol (vitamina E) e ácido ascórbico (vitamina C) sobre os efeitos causados pela administração aguda de prolina em alguns parâmetros de estresse oxidativo, denominados quimiluminescência e TRAP em homogeneizado de córtex cerebral de ratos.
2. Investigar o efeito do pré-tratamento com vitaminas E e C sobre a redução da atividade da enzima antioxidante CAT em homogeneizado de córtex cerebral de ratos submetidos à hiperprolinemia aguda.
3. Avaliar o efeito da administração concomitante de vitaminas E e C à administração crônica de prolina sobre a atividade das enzimas antioxidantes CAT e GSH-Px em homogeneizado de córtex cerebral de ratos.

Capítulo II

Objetivos específicos

1. Verificar o efeito da administração aguda e crônica de prolina sobre a atividade da AChE em homogeneizado de córtex cerebral de ratos.
2. Investigar o efeito da administração aguda e crônica de prolina sobre a atividade da BuChE em soro de ratos.
3. Verificar o efeito do pré-tratamento com vitaminas E e C ou da vitamina E isolada sobre os efeitos causados pela prolina na atividade da AChE em homogeneizado de córtex cerebral de ratos.
4. Verificar o papel da vitamina E, da vitamina C, do N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), um inibidor da óxido nítrico sintase (NOS) e da melatonina sobre os efeitos causados pela prolina na atividade da AChE em homogeneizado de córtex cerebral de ratos.

Capítulo III

Objetivos específicos

- 1 Verificar o efeito da administração aguda e crônica de prolina sobre a atividade da enzima COX em córtex cerebral de ratos de 29 e 60 dias de idade.
- 2 Investigar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de prolina sobre a atividade da enzima COX em córtex cerebral de ratos de 29 e 60 dias de idade.
- 3 Verificar a influência do pré-tratamento com vitaminas E e C sobre o efeito causado pela administração aguda de prolina na atividade da COX em homogeneizado de córtex cerebral de ratos de 29 e 60 dias.
- 4 Avaliar o efeito da administração de vitaminas E e C durante a administração crônica de prolina sobre a atividade da enzima COX em córtex cerebral de ratos de 29 dias.

Capítulo IV

Objetivos específicos

- 1 Investigar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de prolina sobre a captação do glutamato em fatias de córtex cerebral e hipocampo de ratos.
- 2 Verificar o efeito da administração aguda de prolina sobre a captação do glutamato em fatias de córtex cerebral e hipocampo de ratos.
- 3 Verificar a influência do pré-tratamento com vitaminas E e C administradas juntas ou isoladas sobre o efeito causado pela administração aguda de prolina na captação de glutamato em fatias de córtex cerebral de ratos.
- 4 Avaliar o efeito da administração aguda de prolina sobre a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase em homogeneizado de córtex cerebral de ratos e a influência do pré-tratamento com vitaminas E e C sobre o efeito causado pela administração aguda de prolina na atividade da Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral de ratos.

Capítulo V

Objetivos específicos

- 1 Verificar o efeito da administração aguda e crônica de prolina sobre a atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase em sinaptossomas obtidos de córtex cerebral de ratos.
- 2 Investigar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de prolina sobre a atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase em sinaptossomas obtidos de córtex cerebral de ratos.

Capítulo VI

Objetivos específicos

- 1 Verificar o efeito da administração aguda de prolina sobre a hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP em soro de ratos sacrificados 1h, 3h ou 12h após a injeção.
- 2 Investigar o efeito da administração crônica de prolina sobre a hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP em soro de ratos sacrificados 3h ou 12h após a última injeção.
- 3 Verificar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de prolina sobre a hidrólise dos nucleotídeos em soro de ratos.

Capítulo VII

Objetivos específicos

- 1 Investigar se o tratamento crônico com as vitamina E e C previne o prejuízo na memória espacial e na memória de trabalho observado em ratos submetidos à administração crônica de prolina.

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

III. RESULTADOS E METODOLOGIAS

CAPÍTULO I – ARTIGO 01

Protective effect of antioxidants on brain oxidative damage caused by proline administration

Daniela Delwing, Fábria Chiarani, Caren S. Bavaresco, Clóvis M.D. Wannmacher,
Moacir Wajner, Carlos S. Dutra-Filho and Angela T.S. Wyse.

Periódico: Neuroscience Research
Status: Publicado

CAPÍTULO II – ARTIGO 02

**Effect of hyperprolinemia on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase
activities in rat**

Daniela Delwing, Fábria Chiarani, Clóvis M.D. Wannmacher, Moacir Wajner and
Angela T.S. Wyse

Periódico: Amino Acids
Status: Publicado

CAPÍTULO III– ARTIGO III

Proline reduces brain cytochrome c oxidase: prevention by antioxidants

Daniela Delwing, Débora Delwing, Fábria Chiarani, Andréa G. Kurek and Angela T.S. Wyse

Periódico: International Journal of Developmental Neuroscience
Status: Publicado

CAPÍTULO IV– ARTIGO 04

**Proline promotes decrease in glutamate uptake in slices of cerebral cortex
and hippocampus of rats**

Daniela Delwing, Débora Delwing, Renan J. Sanna, Susana Wofchuk and Angela

T.S. Wyse

Periódico: Life sciences

Status: Aceito

CAPÍTULO V– ARTIGO 05

**Proline induces alterations on nucleotide hydrolysis in synaptosomes
from cerebral cortex of rats**

Daniela Delwing, Débora Delwing, João J.F. Sarkis and Angela T.S. Wyse*

**Periódico: Developmental Brain Disease
Status: Publicado**

CAPÍTULO VI– ARTIGO 06

Proline induces alterations in nucleotide hydrolysis in rat blood serum

Daniela Delwing, Débora Delwing, João J.F. Sarkis and Angela T.S. Wyse

Periódico: Molecular and Cellular Biochemistry
Status: Publicado

CAPÍTULO VII – ARTIGO 07

**α -Tocopherol and ascorbic acid prevent memory deficits provoked by
chronic hyperprolinemia in rats**

Daniela Delwing, Caren S. Bavaresco, Siomara C. Monteiro, Cristiane Matté,
Carlos Alexandre Netto and Angela T.S. Wyse

Periódico: Behavioural Brain Research
Status: Publicado

IV. DISCUSSÃO

A hiperprolinemia tipo II é uma doença genética causada pela deficiência hepática na atividade da enzima Δ^1 -pirrolino-5-carboxilato-desidrogenase e se caracteriza bioquimicamente por níveis elevados de prolina no plasma e no fluído cerebro-espinhal. Verifica-se que alguns pacientes com quadro bioquímico de hiperprolinemia tipo II apresentam retardo mental e epilepsia, enquanto que outros pacientes são clinicamente normais (Phang et al., 2001).

Os níveis plasmáticos de prolina encontram-se elevados em ambos os pacientes, o que poderia indicar que altos níveis desse aminoácido não são suficientes para causar dano neurológico. Por outro lado, a literatura correlaciona os altos níveis de prolina encontrados nos pacientes hiperprolinêmicos com manifestações neurológicas, sugerindo que a hiperprolinemia pode predispor a convulsões (Flynn et al., 1989). A alta incidência de convulsões durante a infância na hiperprolinemia tipo II pode ser explicada pelo fato da prolina possuir propriedades neuroexcitatórias e neurotóxicas (Flynn et al., 1989). Embora as disfunções neurológicas sejam observadas em muitos pacientes hiperprolinêmicos, os mecanismos responsáveis por essas são pouco compreendidos.

O modelo animal de hiperprolinemia tipo II utilizado nesse trabalho foi o mesmo utilizado em outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa e baseia-se no modelo experimental desenvolvido por Moreira e colaboradores (1989). Nesse modelo, para atingir níveis séricos de prolina em ratos, similares àqueles encontrados em pacientes hiperprolinêmicos, foram administradas por via subcutânea, várias doses de prolina, as quais variaram de acordo com o peso e a idade dos ratos. Os animais controles

receberam igual volume de solução salina 0,9% (1ml/100 g de peso corporal). As soluções foram administradas duas vezes ao dia, com intervalos de 10 horas. O esquema final para administração crônica de prolina foi calculado de acordo com parâmetros farmacocinéticos da prolina (Moreira et al., 1989). As estruturas cerebrais utilizadas para a realização dos experimentos foram o córtex cerebral e o hipocampo, que são estruturas essenciais para a memória e o aprendizado (Roof et al., 1993; Liu e Bilkey, 1998; Squire, 2004), os quais se encontram comprometidos em pacientes com hiperprolinemia tipo II.

Resultados obtidos em nosso laboratório têm mostrado que a administração aguda de prolina ou a presença de prolina no meio de incubação induz o estresse oxidativo, uma vez que aumenta a quimiluminescência (um índice de peroxidação lipídica) e diminui o TRAP (um índice de defesa total antioxidante não-enzimática tecidual) (Delwing et al., 2003b,c). Nossos resultados também mostraram que a administração aguda de prolina reduz a atividade da CAT (enzima responsável pela detoxificação do H_2O_2) e que a hiperprolinemia crônica aumenta a atividade dessa enzima e reduz a atividade da GSH-Px (enzima que decompõe os peróxidos derivados da oxidação de fosfolipídios de membranas) (Delwing et al., 2003c).

No presente trabalho, considerando os resultados anteriormente citados, primeiramente investigamos a influência do pré-tratamento com as vitaminas E e C sobre o aumento da quimiluminescência e a diminuição do TRAP causados pela administração aguda de prolina em córtex cerebral de ratos. Nossos resultados mostraram que as vitaminas E e C são capazes de prevenir a ação da prolina sobre esses parâmetros de estresse oxidativo. Esses resultados estão de acordo com

outros estudos, os quais mostram os efeitos neuroprotetores da vitamina E contra o dano oxidativo tecidual, com ênfase no SNC (Anderson et al., 1988; Hara et al., 1990; Vatassery et al., 2004). A influência da co-administração das vitaminas E e C sobre as alterações causadas pela administração aguda e crônica de prolina nas atividades das enzimas antioxidantes CAT e GSH-Px foi também avaliada. Os resultados mostraram que as vitaminas E e C preveniram a redução na atividade da CAT causada pela administração aguda de prolina, bem como o aumento na atividade da CAT e a redução na atividade da GSH-Px causadas pela hiperprolinemia crônica. Embora não saibamos o exato mecanismo responsável pelo aumento na atividade da CAT causada pela administração crônica de prolina, sugerimos como hipótese uma hiper-estimulação na síntese da enzima, causada pela transcrição genética, como sendo um efeito compensatório ocorrido em consequência do aumento da geração de radicais livres provocado pela prolina. Dados na literatura mostram que as enzimas antioxidantes podem responder ao aumento do estresse oxidativo aumentando suas atividades, a fim de reduzir o dano (Travacio e Llesuy, 1996). Nesse contexto, podemos presumir que a geração do H_2O_2 , EAO inativada pela CAT, pode estar sendo induzida pela prolina. Nesse trabalho, as vitaminas E e C provavelmente preveniram o aumento na atividade da CAT por reduzirem a formação de radicais livres.

Cabe ressaltar que o estresse oxidativo é um importante evento que está relacionado com a fisiopatologia de algumas condições que afetam o SNC, tais como a isquemia cerebral e algumas doenças neurodegenerativas (Reznick e Packer, 1993; Halliwell, 2001; Salvador e Henriques, 2004). A proteção contra o dano oxidativo é

providenciada pelas defesas antioxidantes, incluindo enzimas como a SOD, a CAT e a GSH-Px e por defesas não-enzimáticas como as vitaminas A, C, E (Salvador e Henriques, 2004).

A vitamina E é uma molécula lipossolúvel localizada no interior da bicamada lipídica das membranas, sendo responsável por limitar/inibir a peroxidação lipídica endógena (Niki et al., 1993). A vitamina C é um antioxidante ativo contra radicais livres, sendo capaz de remover radicais hidroxil e superóxidos (Halliwell e Gutteridge, 2000). A vitamina C tem papel importante na regeneração da vitamina E, prolongando dessa maneira, seu efeito antioxidante (Carr e Frei, 1999). Considerando a importância da vitamina C na regeneração da forma reduzida da vitamina E, em nossos estudos a vitamina C foi administrada concomitantemente com a vitamina E, a fim de prolongar o efeito antioxidante da vitamina E (Carr e Frei, 1999).

Tendo em vista que além do desequilíbrio entre a formação e a remoção de radicais livres, as alterações colinérgicas são também eventos importantes associados à fisiopatologia de alguns distúrbios neurodegenerativos (Ballard et al., 2005; Siqueira et al., 2005), a AChE possui papel importante na transmissão colinérgica (Inestrosa e Perelman, 1990) e a redução da AChE cortical tem sido associada com demência (Blokland, 1995; Petersen et al., 1999; O'Brien et al., 2003), decidimos investigar nesse estudo o efeito da administração aguda e crônica de prolina sobre a atividade da enzima AChE em homogeneizado de córtex cerebral de ratos de 29 dias de idade.

Nossos resultados mostraram que a administração aguda de prolina reduziu significativamente a atividade da AChE em córtex cerebral de ratos. Por outro lado, a

administração crônica de prolina não alterou esse parâmetro. Considerando que a BuChE é considerada um marcador periférico do sistema colinérgico central, nesse trabalho também verificamos o efeito da prolina sobre a atividade da BuChE sérica. A administração aguda de prolina aumentou significativamente a atividade da BuChE em soro de ratos e a administração crônica desse aminoácido não alterou esse parâmetro. Esse resultado pode ser interpretado como um mecanismo compensatório ocorrido devido à diminuição da hidrólise da acetilcolina, uma vez que a atividade da AChE está reduzida. Corroborando com nossos dados, relatos da literatura mostram que na doença de Alzheimer avançada a atividade da AChE está reduzida, em contraste com a atividade de BuChE, que está aumentada (Perry et al, 1978; Giacobini, 2003). Considerando que a administração crônica de prolina não alterou a atividade de ambas as enzimas analisadas, sugere-se que a presença de prolina faz-se necessária para tais ações, visto que na administração aguda os animais foram sacrificados 1h após a injeção e no tratamento crônico os animais foram sacrificados 12h após a última injeção de prolina, quando os níveis desse aminoácido já haviam retornado aos valores normais.

Com o objetivo de investigar um dos possíveis mecanismos envolvidos na inibição da atividade da AChE, também verificamos o efeito do pré-tratamento crônico (7 dias) com as vitaminas E e C ou somente com a vitamina E e o tratamento agudo com a vitamina E, ácido ascórbico, L-NAME e melatonina sobre o efeito inibitório da hiperprolinemia aguda sobre a atividade da AChE. Ambos os tratamentos foram capazes de prevenir a redução observada na atividade da AChE causada pela administração de prolina. Em relação à administração aguda dos antioxidantes

citados acima e do L-NAME, todos preveniram a inibição da atividade da AChE causada pela prolina. Esses resultados estão em concordância com outros achados reportados na literatura, indicando que a atividade da AChE é reduzida por radicais livres e prevenida por antioxidantes (Tsakiris et al., 2000; Melo et al., 2003).

A melatonina, um dos antioxidantes utilizado em nossa pesquisa, possui propriedades lipofílicas e hidrofílicas, se difunde amplamente nos compartimentos celulares e é relatada como um potente “scavenger” de radicais livres, sendo considerada também um estimulador de muitas enzimas antioxidantes (Reiter, 1999). O L-Name, um dos compostos utilizado, é um potente inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual catalisa a conversão de arginina a óxido nítrico e citrulina (Law et al., 2001).

Evidências mostram que além do estresse oxidativo, o déficit energético também está associado aos mecanismos fisiopatológicos de várias desordens que afetam o SNC, incluindo as doenças neurodegenerativas (Reznick e Packer, 1993; Andersen et al., 1997; Chinta e Andersen, 2006; Onyango e Khan, 2006). Tendo em vista que o aumento dos níveis de radicais livres pode causar dano aos componentes mitocondriais e iniciar processos degradativos (Cadenas e Davies, 2000), que a COX, um importante marcador do metabolismo aeróbico, é inibida por radicais livres (Cadenas e Davies, 2000; Sharpe e Cooper, 1998) e considerando que a prolina induz o estresse oxidativo (Delwing et al., 2003b,c) e causa alterações no estado redox da célula (Phang et al., 2001), o propósito dessa etapa de nossos estudos foi investigar os efeitos *in vivo* (agudo e crônico) e *in vitro* da prolina sobre a atividade da enzima COX em córtex cerebral de ratos de 29 e 60 dias. A influência das vitaminas

E e C sobre os efeitos provocados pela administração aguda e crônica de prolina foi também avaliada com o intuito de investigar a participação do estresse oxidativo sobre tais efeitos.

Nossos resultados mostraram que a administração aguda de prolina reduziu a atividade da COX em córtex cerebral de ratos de 29 e 60 dias de idade, indicando que a prolina compromete o funcionamento da CR. Em adição, mostramos que a administração crônica de prolina também reduziu esse parâmetro em ratos de 29 dias, mas em contraste, não alterou a atividade desse complexo em ratos de 60 dias. Analisando esses dados, podemos sugerir que a inibição da COX depende da presença da prolina, uma vez que a redução da atividade do complexo somente ocorreu 12h após a administração de prolina e não ocorreu quando o tratamento com prolina foi interrompido por 30 dias (ratos de 60 dias).

Em relação aos experimentos *in vitro*, os resultados mostraram que a adição de diferentes concentrações de prolina (3,0 μ M – 1,0 mM) ao ensaio enzimático não alterou a atividade da COX em ratos de 29 e 60 dias de idade, sugerindo que esse efeito pode ser causado por metabólitos secundários e não pela interação direta do aminoácido com a enzima.

Estudos indicam que a inibição na atividade da COX ou de qualquer outro complexo da CR pode potencialmente conduzir a uma incompleta redução do oxigênio e, conseqüentemente, ao aumento da formação de radicais livres e diminuição da síntese de ATP (Bose et al., 1992; Milatovic et al., 2001; Gupta et al., 2002). Nesse cenário, a literatura aponta a vitamina E como um antioxidante essencial para o cérebro, fundamental para a respiração mitocondrial eficiente

(Vatassery, 1998; Vatassery et al., 2004) e, recentemente, tem-se sugerido que a vitamina E possa ter um papel específico na manutenção da fosforilação oxidativa (Vatassery et al., 2004).

Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com as vitaminas E e C preveniu o déficit do metabolismo energético (redução da COX) causado pela administração aguda de prolina em ratos de 29 e 60 dias. Esses dados sugerem que radicais livres removidos pelas vitaminas E e C estão provavelmente envolvidos nos efeitos causados pela prolina sobre esse parâmetro do metabolismo energético cerebral. Nossos resultados também mostraram que a administração dos antioxidantes concomitantemente ao tratamento crônico com prolina foi capaz de prevenir a redução causada pela prolina na atividade da COX. Confirmando nossa hipótese, os resultados mostram que o estresse oxidativo possivelmente está envolvido na ação desse aminoácido sobre o complexo analisado. Assim, é possível que o déficit no metabolismo energético e o estresse oxidativo produzido pela prolina possam agir sinergicamente, cooperando para o dano cerebral observado na hiperprolinemia tipo II.

Dando continuidade aos nossos estudos e considerando que a prolina pode potencializar a ação do glutamato (Nadler, 1987, Nadler et al., 1992; Fremeau et al., 1992; Renick et al., 1999) e que a excitotoxicidade glutamatérgica tem sido associada com a patogênese de várias desordens agudas e crônicas que afetam o SNC, como epilepsia, isquemia e doença de Alzheimer (Meldrum, 1994, 2000; Bradford, 1995; Chapman, 2000; Maragakis e Rothstein, 2001, 2004), primeiramente, o objetivo dessa

etapa do trabalho foi investigar os efeitos *in vitro* e *in vivo* (agudo) da prolina sobre a captação do glutamato em fatias de córtex cerebral e hipocampo de ratos.

Os resultados mostraram que a adição de prolina ao ensaio enzimático foi capaz de reduzir a captação do glutamato em fatias de córtex cerebral, nas concentrações de 30,0 μ M e 1,0 mM (prolina), bem como em fatias de hipocampo de ratos, porém somente na concentração de 1,0 mM (prolina), sugerindo um efeito promovido pela interação direta da prolina sobre a captação do glutamato. Tendo em vista que a prolina *in vitro* diminuiu a captação do glutamato em fatias de córtex cerebral e hipocampo de ratos, avaliamos o efeito da administração aguda de prolina sobre o mesmo parâmetro. Verificamos que a administração aguda reduziu significativamente a captação do glutamato em fatias de córtex cerebral de ratos, mas não alterou a captação do glutamato em fatias de hipocampo, sugerindo um efeito causado pela interação direta da prolina e/ou ocasionado por metabólitos secundários. Sabendo que a captação do glutamato por astrócitos é o principal processo envolvido na neuroproteção contra a excitotoxicidade glutamatérgica, por reduzir as concentrações extracelulares de glutamato (Chen e Swanson, 2003), o efeito inibitório causado pela prolina sugere que esse aminoácido possui propriedades tóxicas que interferem na captação do glutamato.

Uma vez que a literatura relata que os radicais livres são altamente reativos e podem inibir a captação do glutamato em cultura de astrócitos (Danbolt, 2001) e que a prolina induz o estresse oxidativo (Delwing et al., 2003b,c), também investigamos se o pré-tratamento com as vitaminas E e C seria capaz de prevenir a redução na captação do glutamato em fatias de córtex cerebral de ratos causada pela

hiperprolinemia aguda. Nossos resultados mostraram que esses antioxidantes quando administrados simultaneamente *per se* reduziram a captação do glutamato em vez de preveni-la. Baseado nesses resultados, na tentativa de descobrir se essa redução foi causada por apenas um dos antioxidantes usados e também com a intenção de investigar se esses antioxidantes quando administrados isolados seriam capaz de prevenir a redução causada pela prolina sobre o parâmetro estudado, também verificamos o efeito do pré-tratamento com vitamina E e vitamina C isoladamente. Os resultados mostraram que o pré-tratamento com vitamina E reduziu a captação do glutamato em fatias de córtex cerebral e não preveniu a redução desse parâmetro causada pela administração de prolina. Em contraste, o pré-tratamento com vitamina C não alterou a captação do glutamato, mas também não foi capaz de prevenir a redução desse parâmetro causada pela prolina, sugerindo que a redução da captação do glutamato provavelmente não foi causada por radicais livres removidos pelas vitaminas E e C.

Considerando que a Na^+, K^+ -ATPase é uma enzima responsável pela geração do potencial de membrana através do transporte ativo dos íons Na^+ e K^+ , os quais são necessários para a manutenção da excitabilidade neuronal bem como pelo controle do volume celular (Wheller et al., 1975; Erecinska e Silver, 1994; Erecinska et al., 2004), que a prolina reduz a atividade dessa enzima em hipocampo de ratos (Pontes et al., 2001) e que a captação do glutamato é dependente de Na^+ (Danbolt, 2001), nosso próximo objetivo foi investigar o efeito da administração aguda de prolina e o efeito do pré-tratamento com antioxidantes (vitaminas E e C) sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral de ratos. Os resultados mostraram que a

administração aguda de prolina reduziu a atividade da enzima e que os antioxidantes utilizados preveniram tal efeito. Esses achados sugerem que o estresse oxidativo esteja provavelmente envolvido nos efeitos elicitados pela prolina sobre o parâmetro analisado. Nossos resultados sugerem que a redução da captação do glutamato por células gliais não foi mediada pela inibição na atividade da Na^+, K^+ -ATPase causada pela prolina, uma vez que os antioxidantes preveniram esse efeito. Provavelmente a redução da captação do glutamato foi causada por outras espécies reativas, tais como o óxido nítrico, visto que a prolina ativa receptores NMDA.

A fim de dar continuidade aos nossos estudos e ampliar nosso campo de pesquisa, e considerando que as enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase estão amplamente distribuídas no cérebro (Bonan et al., 1998), nosso próximo objetivo foi avaliar os efeitos *in vivo* (agudo e crônico) e *in vitro* da prolina sobre a atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase em sinaptossomas obtido de córtex cerebral de ratos.

Nossos resultados mostraram que a administração aguda de prolina reduziu significativamente a hidrólise do ATP, mas não alterou a hidrólise dos nucleotídeos ADP e AMP em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos. Resultados similares foram encontrados após a administração crônica de prolina, onde verificamos que somente ocorreu redução da hidrólise do nucleotídeo ATP. Em relação à adição de prolina ao ensaio enzimático (estudos *in vitro*), observamos que a prolina não alterou as atividades das enzimas envolvidas na hidrólise dos nucleotídeos. Considerando que a redução da hidrólise do ATP ocorreu somente após a administração aguda e crônica de prolina, podemos sugerir que esse foi um efeito indireto e que não foi

ocasionado pela interação direta da prolina com a enzima envolvida. Não sabemos os mecanismos pelos quais a administração de prolina reduz a atividade da NTPDase, mas considerando que a adição de prolina ao meio de incubação (estudo *in vitro*) não alterou a hidrólise do ATP, podemos sugerir que metabólitos secundários da prolina, assim como o Δ^1 -pirrolino-5-carboxilato, possa estar envolvido nesses efeitos.

Corroborando com nossos resultados, estudos realizados em nosso laboratório mostraram que outros aminoácidos acumulados em EIM também alteram a atividade das enzimas responsáveis pela hidrólise dos nucleotídeos. A fenilalanina reduz a atividade da NTPDase em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos (Wyse et al., 1994, 1995), a administração de homocisteína altera a atividade das enzimas envolvidas na hidrólise dos nucleotídeos em cérebro e soro de ratos (Böhmer et al., 2004) e a infusão intracerebroventricular de arginina reduz a atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase em sinaptossomas de hipocampo de ratos (Delwing et al., 2007). Além disso, relatos da literatura mostram que alterações na atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase parecem estar relacionadas a desordens neurológicas, tais como a isquemia cerebral (Schetinger et al., 1998).

Estudos bioquímicos citam os nucleotídeos de adenina como uma importante fonte de adenosina extracelular (Battastini et al., 1995; Cunha et al., 2001; Dunwiddie e Masino, 2001). A concentração de nucleotídeos presentes em um determinado meio biológico é o resultado do equilíbrio existente entre a liberação desses nucleotídeos e seu metabolismo através de nucleotidases apropriadas. Nesse contexto, no SNC, os tri- e difosfonucleotídeos são degradados por três enzimas da família das NTPDases, denominadas NTPDase 1, 2 e 3 (Kegel et al., 1997; Smith e

Kirley, 1998; Wang et al., 1997). A NTPDase 1 hidrolisa ATP e ADP igualmente bem, sendo a proporção de hidrólise de 1:1 (Kaczmarek et al., 1996; Wang e Guidotti, 1996; Zimmermann, 2001) enquanto que a NTPDase 2 tem uma preferência maior pela hidrólise do ATP do que ADP, sendo a proporção de hidrólise de 30:1. Por outro lado, a NTPDase 3 apresenta propriedades funcionais intermediárias entre a NTPDase1 e a NTPDase 2 e hidrolisa o ATP em uma velocidade aproximadamente três vezes maior que o ADP (Mateo et al.,1999; Smith e Kirley, 1998). Baseado nessas informações e analisando nossos resultados, podemos sugerir que a enzima envolvida na hidrólise dos nucleotídeos adenínicos em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos hiperprolinêmicos é a NTPDase 2, visto que a administração aguda e crônica de prolina reduziu a hidrólise do ATP, mas não alterou a hidrólise dos demais nucleotídeos.

Tem sido demonstrado na literatura que a adenosina é, de fato, consensualmente reconhecida como uma substância muito importante para a homeostasia das células do SNC. A adenosina é um nucleosídeo endógeno que apresenta papel fundamental na regulação da excitabilidade neuronal e estudos mostram que possui papel importante na modulação da plasticidade sináptica em ratos (De Medonça e Ribeiro, 1997; Dunwiddie e Masino, 2001). Além disso, a adenosina também é considerada um neuromodulador endógeno que apresenta propriedades anticonvulsivante e neuroprotetora (Dunwiddie e Masino, 2001; Latini e Pedata, 2001).

Nesse capítulo nossos resultados mostraram que a prolina reduziu a hidrólise do ATP, o que provavelmente contribuiu para o aumento dos níveis de ATP. Sabendo

que o ATP é um importante neurotransmissor excitatório no SNC, a inibição da hidrólise do ATP causada pela administração de prolina pode prejudicar uma série de processos relacionados com a excitabilidade cerebral e esse pode ser, pelo menos em parte, um dos mecanismos responsáveis pela disfunção neurológica apresentada por pacientes hiperprolinêmicos.

Além dos sintomas neurológicos da doença observados em muitos pacientes hiperprolinêmicos (Phang et al., 2001), dados da literatura mostram que a prolina provoca alterações no sistema cardiovascular (Takemoto, 2004). Considerando esse fato e sabendo que a razão nucleotídeos/nucleosídeo na circulação pode apresentar algumas mudanças, as quais podem evocar respostas tanto no sistema circulatório quanto no SNC e que a administração de prolina reduziu a hidrólise do ATP em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos (Delwing et al., 2007), o próximo objetivo do nosso trabalho foi investigar os efeitos *in vivo* (agudo e crônico) e *in vitro* da prolina sobre a hidrólise do ATP, ADP e AMP em soro de ratos.

Os resultados mostraram que a administração aguda de prolina reduziu significativamente a hidrólise do ATP e do ADP em soros de ratos, mas não alterou a hidrólise do AMP, sugerindo que esses efeitos possam estar ocorrendo através de metabólitos secundários e/ou através da interação direta da prolina com as enzimas envolvidas. Esses resultados estão em concordância com outros experimentos realizados, onde se verificou que aminoácidos como a fenilalanina (Wyse et al., 1994) e a arginina (Delwing et al., 2005) reduziram a atividade da NTPDase em soro de ratos. De acordo com nossos resultados, a administração crônica de prolina não alterou a hidrólise dos nucleotídeos testados, sugerindo que a presença de prolina é

necessária para essa ação, uma vez que na administração aguda os animais foram sacrificados 1h após a injeção e no tratamento crônico os animais foram sacrificados somente 12h após a última injeção, provavelmente quando os níveis de prolina já haviam retornado ao normal.

A próxima etapa desse estudo foi verificar se os animais sacrificados 3h ou 12h após a administração aguda de prolina ou 3h após a administração crônica de prolina apresentariam alterações na hidrólise dos nucleotídeos. Os resultados mostraram que animais sacrificados 3h ou 12h após a administração aguda de prolina não apresentaram alterações na hidrólise dos nucleotídeos, o que explica porque o tratamento crônico com prolina não alterou os parâmetros avaliados, novamente sugerindo que os altos níveis de prolina são essenciais para essa ação. Por outro lado, animais sacrificados 3h após a última injeção de prolina (administração crônica) apresentaram redução significativa na hidrólise do ATP e do ADP, demonstrando um efeito causado pela presença de prolina associado a um efeito indireto da prolina em longo prazo.

Demonstramos também nesse estudo que a adição de 1,0 mM de prolina ao meio (*in vitro*) aumentou a hidrólise do ATP, ADP e AMP, sugerindo que a prolina interage diretamente com as enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase, o que resulta no aumento de suas atividades. Analisando os resultados obtidos, podemos sugerir que a enzima envolvida na hidrólise dos nucleotídeos adenínicos é a NTPDase 1 (também conhecida como CD39, ecto-apirase, ecto-ATP difosfohidrolase), uma vez que essa hidrolisa ATP e ADP igualmente bem, sendo a proporção de hidrólise de 1:1 (Zimmermann, 2001; Oses et al., 2004).

Adicionalmente, foi demonstrado que a estimulação elétrica de nervos simpáticos provoca a liberação de nucleotidasas solúveis que estão envolvidas na completa degradação do ATP até adenosina (Todorov et al., 1997). As NTPDases possuem papel fundamental na manutenção das condições fisiológicas; regulando a função cardíaca, a secreção hormonal, as respostas imunes, a neurotransmissão e a agregação plaquetária; através da modulação dos níveis de nucleotídeos no soro (Marcus et al., 1997; Todorov et al., 1997; Chadwick e Frischauf, 1998; Gayle et al., 1998; Burnstock e Williams, 2000).

Considerando o papel do ATP no sistema vascular como vasoconstrictor e o papel do ADP na agregação plaquetária (Ralevic e Burnstock, 2003), que a prolina causa alterações no sistema cardiovascular (Takemoto, 2004) e que nossos resultados mostraram que a prolina altera a hidrólise dos nucleotídeos, pode-se postular que pacientes hiperprolinêmicos não tratados possam apresentar alguns tipos de problemas circulatórios, sugerindo dessa forma, que a determinação da atividade da NTPDase em soro possa ser um dos parâmetros utilizados para a caracterização da doença.

Dando continuidade aos nossos estudos e considerando que os pacientes hiperprolinêmicos usualmente apresentam um grau variável de retardo mental e outros sintomas neurológicos (Phang et al., 2001), que a hiperprolinemia crônica induz o estresse oxidativo cerebral (Delwing et al., 2003b,c) e provoca déficit de memória em ratos (Bavaresco et al., 2005) e que o estresse oxidativo pode estar associado ao déficit cognitivo, investigamos o efeito do tratamento com vitaminas E e C sobre a performance cognitiva dos ratos submetidos à administração crônica de

prolina. Para esse estudo utilizamos a tarefa do labirinto aquático de Morris que nos permite avaliar a memória espacial e a memória de trabalho em ratos.

De acordo com D'Hooge e De Deyn (2001) o labirinto aquático de Morris é uma tarefa adequada para avaliar a cognição em ratos. Na primeira fase da tarefa, durante um período adequado de dias de treinamento, os animais aprendem, guiados por pistas colocadas nas paredes da sala (mapeamento ou estratégia espacial), o local da plataforma de escape. Os resultados mostraram que os ratos submetidos a administração crônica de prolina apresentaram um déficit na fase de aquisição da tarefa, demorando mais tempo para encontrar a plataforma de escape durante os dias de treinamento. No dia do teste, os ratos hiperprolinêmicos demoraram mais tempo para cruzar o local da plataforma e o número de vezes que esses passaram pelo local da plataforma foi reduzido em relação aos ratos controles. Por outro lado, o tempo em que permaneceram no quadrante alvo onde estava localizada a plataforma de escape e o tempo em que permaneceram no quadrante oposto ao da plataforma não alterou. Interessantemente, o concomitante tratamento com as vitaminas E e C foi capaz de prevenir os efeitos causados pela administração crônica de prolina.

De acordo com os resultados, a administração crônica de prolina também alterou a memória de trabalho, tarefa responsável pela avaliação da memória de curta duração. Nessa etapa, os ratos cronicamente tratados com prolina apresentaram maior latência para encontrar a posição da plataforma no terceiro e no quarto dia de estudo. Os resultados apresentados por esses em relação ao primeiro e segundo dia foram semelhantes aos observados nos demais grupos. Esses resultados foram prevenidos pela administração concomitante de vitaminas E e C durante o tratamento

crônico com prolina. Acreditamos que a hiperprolinemia tipo II causa um déficit na memória espacial e na memória de trabalho, independente das habilidades motoras do animal, uma vez que não foram encontradas alterações na velocidade do nado.

Existem evidências de que o estresse oxidativo e as EAO parecem estar envolvidas na modulação dos mecanismos de memória e aprendizado (Abidin et al., 2004; Bickford et al., 2000; Cantuti-Castelvetri et al., 2000; Silva et al., 2004). Esses têm sido propostos a serem os maiores contribuintes da disfunção neurológica presente em muitas doenças neurodegenerativas (Bergendi et al., 1999). Corroborando com esses dados, estudos apontam que a vitamina E melhora a função cognitiva em pacientes com radionecrose no lobo temporal (Chan et al., 2004) e que a vitamina E pode ser benéfica na redução do déficit cognitivo presente em pacientes com a doença de Alzheimer (Mecocci et al., 2004).

Confirmando nossa hipótese, os resultados mostraram que a co-administração de vitaminas E e C durante o tratamento crônico com prolina preveniu as ações da prolina, sugerindo que o estresse oxidativo provavelmente esteja contribuindo para o déficit de memória apresentado por esses animais. Esses resultados estão em concordância com outros experimentos realizados em nosso grupo de pesquisa, onde verificou-se que a administração dessas vitaminas preveniu o prejuízo na memória causado pela hiperhomocisteinemia (Reis et al., 2002). De acordo com os nossos resultados, o desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes causado pela administração de prolina pode estar contribuindo para o prejuízo na memória encontrado nesse trabalho.

Embora pouco se conheça sobre os mecanismos responsáveis pelo dano cerebral apresentado por pacientes hiperprolinêmicos, nosso trabalho mostrou que a prolina reduziu a atividade da AChE e aumentou a atividade da BuChE. Verificamos também que a administração de prolina comprometeu o metabolismo energético cerebral, uma vez que houve redução na atividade da enzima citocromo c oxidase. Além disso, também observamos que a prolina reduziu a captação do glutamato e a atividade da Na^+, K^+ -ATPase. Os efeitos relatados provavelmente ocorreram pela geração de radicais livres, visto que antioxidantes importantes como as vitaminas E e C preveniram tais efeitos, exceto a redução da captação do glutamato, que provavelmente foi mediada por radicais livres que não são removidos por esses antioxidantes. Corroborando com essa hipótese, a administração de vitaminas E e C também preveniu o déficit de memória e as alterações causadas pela prolina sobre vários parâmetros de estresse oxidativo, como o aumento da quimioluminescência, a redução do TRAP e as alterações nas atividades das enzimas antioxidantes CAT e GSH-Px. Cabe ressaltar que o L-NAME e melatonina também preveniram a ação da prolina causada sobre a AChE.

Também mostramos nesse trabalho que a prolina alterou a hidrólise de nucleotídeos adenínicos em sinaptossomas de córtex cerebral e em soro de ratos.

De um modo geral, nossos resultados em conjunto, mostram que a hiperprolinemia tipo II causa uma série de alterações bioquímicas, as quais podem contribuir para as disfunções neurológicas características da doença. Além disso, se esses resultados forem confirmados em humanos, poderíamos sugerir que a suplementação com antioxidantes (vitaminas E e C) possa ser utilizada como uma

estratégia terapêutica no tratamento de alguns sintomas associados à hiperprolinemia.

V. CONCLUSÕES

A administração aguda de prolina:

- Reduziu a atividade da enzima AChE em córtex cerebral de ratos de 29 dias e aumentou a atividade da enzima sérica BuChE.
- Reduziu a atividade da enzima COX em córtex cerebral de ratos de 29 e 60 dias.
- Reduziu a captação do glutamato observada em fatias de córtex cerebral de ratos de 29 dias.
- Reduziu a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral de ratos de 29 dias.
- Reduziu significativamente a hidrólise do ATP em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos de 29 dias, em contraste, não alterou a hidrólise dos nucleotídeos ADP e AMP.
- Reduziu significativamente a hidrólise do ATP e do ADP em soro de ratos de 29 dias sacrificados 1h após a injeção de prolina, mas não alterou a hidrólise do nucleotídeo AMP.
- Não alterou a hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP em soro de ratos de 29 dias sacrificados 3h ou 12h após a administração de prolina.

A administração crônica de prolina:

- Não alterou a atividade das enzimas AChE em córtex cerebral e BuChE sérica em ratos de 29 dias.
- Reduziu a atividade da enzima COX em córtex cerebral de ratos de 29 dias, mas não alterou esse parâmetro em ratos de 60 dias.
- Reduziu significativamente a hidrólise do ATP em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos de 29 dias, porém, não alterou a hidrólise dos nucleotídeos adenínicos ADP e AMP.
- Reduziu significativamente a hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP em soro de ratos de 29 dias sacrificados 3h após a última injeção de prolina, mas não alterou a hidrólise dos nucleotídeos quando os ratos foram sacrificados 12h após a última injeção de prolina.

A adição de prolina ao ensaio enzimático:

- A adição de diferentes concentrações de prolina (3,0 μ M - 1,0 mM) no meio de incubação não alterou a atividade da enzima COX em córtex cerebral de ratos de 29 e 60 dias.
- A adição de prolina ao ensaio enzimático reduziu a captação do glutamato em fatias de córtex cerebral e hipocampo de ratos de 29 dias.
- A adição de diferentes concentrações de prolina (3,0 μ M - 1,0 mM) ao meio de incubação não alterou a hidrólise dos nucleotídeos adenínicos (ATP, ADP e AMP) em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos de 29 dias.

- A adição de prolina ao ensaio enzimático aumentou significativamente a hidrólise do ATP, ADP e AMP em soro de ratos.

Pré-tratamento e tratamento com vitaminas E e C:

- Preveniu o aumento da quimiluminescência e a redução do TRAP causados pela administração aguda de prolina.
- Preveniu a redução da CAT causada pela administração aguda de prolina e o aumento da CAT e a redução da GSH-Px causados pela administração crônica de prolina.
- O pré-tratamento com vitaminas E e C combinadas, bem como o pré-tratamento com vitamina E isolada preveniu a redução da atividade da AChE causada pela administração aguda de prolina.
- O tratamento crônico com vitaminas E e C preveniu o déficit de memória espacial e de memória de trabalho, observados no labirinto aquático de Morris, causado pela administração crônica de prolina.
- O pré-tratamento com vitaminas E e C preveniu a redução causada pela administração aguda de prolina sobre a atividade da COX em córtex cerebral de ratos de 29 e 60 dias e o tratamento crônico com vitaminas E e C concomitante a administração crônica de prolina preveniu a redução da COX observada em córtex cerebral de ratos de 29 dias.

- O pré-tratamento com vitaminas E e C combinadas, bem como o pré-tratamento com vitamina E ou com vitamina C isoladas não preveniu a redução da captação do glutamato causada pela administração aguda de prolina.
- O pré-tratamento com vitaminas E e C preveniu a redução da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase causada pela administração aguda de prolina.

Administração aguda de vitamina E, vitamina C, melatonina e L-NAME:

- Todos os antioxidantes citados e o L-NAME foram capazes de prevenir a redução da atividade da AChE causada pela administração aguda de prolina.

Os resultados do presente trabalho em conjunto, mostram que a hiperprolinemia tipo II causa uma série de alterações neuroquímicas, as quais podem contribuir para as disfunções neurológicas características da doença. Além disso, se esses resultados forem confirmados em humanos, poderíamos sugerir que a suplementação com antioxidantes (vitaminas E e C) possa ser utilizada como uma estratégia terapêutica no tratamento de alguns sintomas associados à hiperprolinemia.

ESQUEMA RESUMIDO DOS RESULTADOS OBTIDOS

1. Administração *in vivo* e *in vitro* da prolina sobre alguns parâmetros bioquímicos

	AGUDO	CRÔNICO	IN VITRO
AChE (29 dias)	↓	-	
BuChE (29 dias)	↑	-	
COX	↓ 29 e 60 dias	↓ 29 dias	-
Captação glutamato (29 dias)	↓ córtex cerebral		↓ hipocampo e córtex cerebral
Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase (29 dias)	↓		
Hidrólise de nucleotídeos (soro)(29 dias)	↓ ATP e ADP	↓ ATP e ADP 3h após última inj.	↑ ATP,ADP,AMP
Hidrólise de nucleotídeos (sinaptossomas de córtex cerebral) (29 dias)	↓ ATP	↓ ATP	-

2. Utilização de antioxidantes sobre as alterações causadas pela prolina em alguns parâmetros bioquímicos e comportamentais

	PRÉ- TRATAMENTO (VIT. E e C)	TRATAMENTO CRÔNICO (VIT. E e C)	ADMINISTRAÇÃO AGUDA Vit. E, C, L-NAME, melatonina
Quimiluminescência	preveniu		
TRAP	preveniu		
CAT	preveniu	preveniu	
GSH-Px		preveniu	
AChE	preveniu		preveniram
Déficit memória		preveniu	
COX	preveniu	preveniu	
Captação glutamato	não preveniu		
Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	preveniu		

VI. PERSPECTIVAS

- 1) Verificar a captação de glicose e a liberação de lactato em cérebro de ratos de 29 dias de idade submetidos à administração aguda e crônica de prolina;
- 2) Verificar as atividades das enzimas da cadeia respiratória: NADH-CoQ oxidoreductase (complexo I), succinato DCIP oxidoreductase (complexo II) e succinato: fenazina oxidoreductase (succinato desidrogenase solúvel – SDH), succinato:citocromo c oxidoreductase (complexo II + CoQ + complexo III) e NADH:citocromo c oxidoreductase (complexo I + CoQ + complexo III) em cérebro de ratos de 29 dias de idade submetidos à administração aguda e crônica de prolina;
- 3) Verificar a produção de CO₂ a partir de glicose em cérebro de ratos de 29 dias de idade submetidos à administração aguda e crônica de prolina;
- 4) Verificar o efeito da administração aguda e crônica de prolina sobre a atividade da enzima creatinaquinase em cérebro de ratos de 29 dias de idade;
- 5) Investigar o efeito do pré-tratamento com vitaminas E e C sobre as possíveis alterações no metabolismo energético causadas pela administração aguda e crônica de prolina.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abidin, I., Yargicoglu, P., Agar, A., Gumuslu, S., Aydin, S., Ozturk, O., Sahin, E. (2004). The effect of chronic restraint stress on spatial learning and memory: relation to oxidant stress. *Int. J. Neurosci.* 114: 683-99.
- Aldunate, R., Casar, J.C., Brandan, E., Inestrosa, N.C. (2004). Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. *Brain Res. Rev.* 47: 96–104.
- Andersen, H.R., Nielsen, J.B., Nielsen, F., Grandjean, P. (1997). Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clin. Chem.* 43: 562-568.
- 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.
- Anderson, C.M., Swanson, R.A. (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32: 1–14.
- Applegarth, D.A., Ingram, P.F., Hingston, J., Hardwick, D.F. (1974). Hyperprolinemia Type II. *Clin. Biochem.* 7: 14-28.
- Arriza, J.L., Eliasof, S., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G. (1997). Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 4155–4160.
- Attwell, D. (2000). Brain uptake of glutamate: food for thought. *J. Nutr.* 130: 1023S–1025S.
- Babcock, G.T., Wikström, M. (1992). Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* 356: 301-309.
- Ballard, C.G., Greig, N.H., Guillozet-Bongaarts, A.L., Enz, A., Darvesh, S. (2005). Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. *Curr. Alzheimer Res.* 2(3): 307-318.
- Barrientos, A., Barros, M.H., Valnot, I., Rötig, A., Rustin, P., Tzagoloff, A. (2002). Cytochrome oxidase in health and disease. *Gene* 286: 53-63.

- Battastini, A.M.O., Oliveira, E.M., Moreira, C.M., Bonan, C.D., Sarkis, J.J.F., Dias, R.D. (1995). Solubilization and characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5.) from rat brain plasma membranes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 37: 209-219.
- Bavaresco, C.S., Streck, E.L., Netto, C.A., Wyse, A.T.S. (2005). Chronic hyperprolinemia provokes a memory deficit in the Morris water maze task. *Metab. Brain Dis.* 20: 73-80.
- Bear, M.F., Connors, B. W., Paradiso, M. A. (2002). Sistemas de memória. Em: *Neurociências: desvendando o sistema nervoso*. São Paulo, Artmed Editora S.A., 2ª edição, cap. 23, pp. 740-774.
- Benson, P.F., Fensom, A.H. (1985). *Genetic Biochemical Disorders*. Oxford: Oxford University Press, pp. 692.
- Benzi, G.; Moretti, A. (1998). Is there a rationale for the use of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease? *Eur. J. Pharmacol.* 346:1-13.
- 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). Fosforilação Oxidativa. Em: *Bioquímica*. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 5ª edição, cap. 18, pp. 509-545.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2004c). Canais e bombas de membranas. Em: *Bioquímica*. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 5ª edição, cap. 13, pp. 361-385.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2004d). Estrutura e função das proteínas. Em: *Bioquímica*. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 5ª edição, cap. 3, pp. 43-79.
- 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.

- Bickford, P.C., Gould, T., Briederick, L., Chadman, K., Pollock, A., Young, D., Shukitt-Hale, B., Joseph, J. (2000). Antioxidant –rich diets improve cerebellar physiology and motor learning in aged rats. *Brain Res.* 866: 211-217.
- Biederbick, A., Kosan, C., Kanz, J., Elsasser, H.P. (2000). First apyrase splice variants have different enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* 275:19018-19024.
- Bigonnesse, F., Lévesque, S.A., Kukulski, F., Lecka, J., Robson, S.C., Fernandes, M.J., Sevigny, J. (2004). Cloning and characterization of mouse nucleotide triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry* 43: 5511-5519.
- Blanco, G., Sánchez, G., Melton, R.J., Tourtellotte, W.G., Mercer, R.W. (2000). The $\alpha 4$ isoform of the Na,K-ATPase is expressed in the germ cells of the testes. *J. Histochem. Cytochem.* 48: 1023-1032.
- Blokland, A. (1995). Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Res.* 21: 285-300.
- Böhmer, A.E., Streck, E.L., Stefanello, F., Wyse, A.T.S., Sarkis, J.J.F. (2004). NTPDase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes of hippocampus and serum of rats subjected to homocysteine administration. *Neurochem. Res.* 29: 1373-1378.
- Bonan, C.D., Dias, M.M., Oliveira, A.M.O., Dias, R.D., Sarkis, J.J.F. (1998). Inhibitory avoidance learning inhibits ectonucleotidases activities in hippocampal synaptosomes of adult rats. *Neurochem. Res.* 23: 979-984.
- Bose, R., Schnell, C.P., Pinsky, C., Zitko, V. (1992). Effects of excitotoxins on free radical indices in mouse brain. *Toxicol. Lett.* 60: 211-219.
- Boveris, A., Cadenas, E. (1982). Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In: Oberley, L.W. (Ed.), *Superoxide dismutase*. Boca Raton: CRC Press, pp. 15-30.
- Bowen, D.M., Dawson, A.N. (1986). Biochemical studies of nerve cells and energy metabolism in Alzheimer's disease. *Br. Med. Bull.* 42: 75-80.
- Bradford, H.F. (1995). Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog. Neurobiol.* 47: 477– 511.
- 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.
- Brewer, G.J. (2000). Neuronal plasticity and stressor toxicity during aging. *Exp. Gerontol.* 35: 1165–1183.
- Brigelius-Flohe, R., Kelly, F.J., Salonen, J.T., Neuzil, J., Zingg, J.M., Azzi, A. (2002). The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 703-716.
- Burnstock, G., Williams, M. (2000). P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295: 862-869.
- Burnstock, G. (1999). Purinergic cotransmission. *Brain Res. Bull.* 50: 355-357.
- Butterfield, D.A., Stadtman, E.R. (1997). Protein oxidation processes in aging brain. *Adv. Cell. Aging Gerontol.* 2: 161–191.
- Butterfield, D.A., Howard, B.J., Yatin, S., Allen, K.L., Carney, J.M. (1997). Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation by N-tert-butyl-alpha-phenylnitron. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 674–678.
- Cadenas, E., Davies, K.J.A. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29: 222-230.
- Campiani, G., Fattorusso, C., De Angelis, M., Catalanotti, B., Butini, S., Fattorusso, R., Fiorini, I., Nacci, V., Novellino, E. (2003). Neuronal high-affinity sodium-dependent glutamate transporters (EAATs): targets for the development of novel therapeutics against neurodegenerative diseases. *Curr. Pharm. Des.* 9: 599–625.
- Cantuti-Castelvetri, I., Shukitt-Hale, B., Joseph, J.A. (2000). Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. *Int. J. Dev. Neurosci.* 18: 367-381.
- Capaldi, R.A. (1992). Structure and function of cytochrome oxidase. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 569-596.
- Carr, A., Frei, B. (1999). Does Vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.* 13: 1007-1024.
- Chadwick, B.P., Frischauf, A.M. (1998). The CD39-like gene family: identification of three new human members (CD39L2, CD39L3 and CD39L4), their murine

- homologues, and a member of the gene family from *Drosophila melanogaster*. Genomics 50: 357–367.
- Chakraborty, H., Sen, P., Sur, A., Chatterjee, U., Chakrabarti, S. (2003). Age-related oxidative inactivation of Na⁺,K⁺-ATPase in rat brain crude synaptosomes. Exp. Gerontol. 38: 705-710.
- Chan, A.S., Cheung, M.C., Law, S.C., Chan, J.H. (2004). Phase II study of alpha-tocopherol in improving the cognitive function of patients with temporal lobe radionecrosis. Cancer 100: 398-404.
- Chapman, A.G. (2000). Glutamate and epilepsy. J. Nutr. 130:1043S– 1045S.
- Chen, Y., Swanson, R.A. (2003). Astrocytes and brain injury. J. Cereb. Blood Flow Metab. 23: 137–149.
- Cherkin, A., Eckardt, M.J., Gerbrandt, L.K. (1976). Memory: proline induces retrograde amnesia in chicks. Science 193: 242-244.
- 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.
- Cunha, R., Almeida, T., Ribeiro, J.A. (2001). Parallel modification of adenosine extracellular metabolism and modulatory action in the hippocampus of aged rats. J. Neurochem. 76: 372-382.
- Danbolt, N.C. (2001). Glutamate uptake. Prog. Neurobiol. 65: 1–105.
- Darvesh, S., Hopkins, D.A., Geula, C. (2003). Neurobiology of butyrylcholinesterase. Nat. Rev. Neurosci. 4: 131-138.
- Davey, G.P., Clark, J.B. (1996). Threshold effects and control of oxidative phosphorylation in nonsynaptic rat brain mitochondria. J. Neurochem. 66: 1617-1624.
- Delwing, D., Chiarani, F., Delwing, D., Bavaresco, C.S., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., Wyse, A.T.S. (2003a). Proline reduces acetylcholinesterase activity in cerebral cortex of rats. Metab. Brain Dis. 18: 79-86.

- Delwing, D., Bavaresco, C.S., Chiarani, F., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T.S. (2003b). *In vivo* and *in vitro* effects of proline on some parameters of oxidative stress in rat brain. *Brain Res.* 991: 180-186.
- Delwing, D., Bavaresco, C.S., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T.S. (2003c). Proline induces oxidative stress in cerebral cortex of rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 21: 105-110.
- Delwing, D., Gonçalves, M.C.F., Sarkis, J.J.F., Wyse, A.T.S. (2005). L-NAME administration prevents the inhibition of nucleotide hydrolysis by rat blood serum subjected to hyperargininemia. *Amino Acids* 29: 267–272.
- Delwing, D., Delwing, D., Sarkis, J.J.F., Wyse, A.T.S. (2007). Proline induces alterations on nucleotide hydrolysis in synaptosomes from cerebral cortex of rats. *Dev. Brain Dis.* 1149: 210-215.
- Delwing, D., Delwing, D., Gonçalves, M.C.F., Sarkis, J.J.F., Wyse, A.T.S. (2007). NTPDase and 5'-nucleotidase activities of synaptosomes from hippocampus of rats subjected to hyperargininemia. *Neurochem. Res.* 32: 1209-1216.
- 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, pp. 462-463.
- De Mendonça, A., Ribeiro, J.A. (1997). Adenosine and neuronal plasticity. *Life Sci.* 60: 245-251.
- D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 36: 60-90.
- Di Donato, S. (1997). Diseases associated with defects of beta-oxidation. In: Rosenberg, R.N., Prisiner, S.B., DiMauro, S. and Barchi, R.L. (Eds.). *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease*, Boston: Butterworth-Heinemann, 2nd ed., pp. 939-956.
- Dobrota, D., Matejovicova, M., Kurrela, E.G., Boldyrev, A.A. (1999). Na/K-ATPase under oxidative stress: molecular mechanisms of injury. *Cell. Mol. Neurobiol.* 19: 141-149.

- Dunnett, S.B., Björklund, A. (1999). Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature* 399S: A32-A39.
- Dunwiddie, T.V., Masino, S.A. (2001). The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 31-55.
- Efron, M.L. (1965). Familial hyperprolinemia. Report of a second case, associated with congenital renal malformations, hereditary hematuria and mild mental retardation, with demonstration of enzyme defect. *N. Engl. J. Med.* 272: 1243.
- Emery, F.A., Goldie, L., Stern, J. (1968). Hyperprolinaemia type II. *J. Mental. Defic. Res.* 12: 187-195.
- Erecinska, M., Silver, I.A. (1994). Ions and energy in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 16: 37-71.
- Erecinska, M., Cherian, S., Silver, I.A. (2004). Energy metabolism in mammalian brain during development. *Prog. Neurobiol.* 73: 397-445.
- Erlinge, D. (1998). Extracellular ATP: a growth factor for vascular smooth muscle cells. *Gen. Pharmacol.* 31: 1-8.
- Fairman, W.A., Vandenberg, R.J., Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G. (1995). An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375: 599-603.
- Fiedler, J.L., Pollard, H.B., Rojas, E. (1992). Quantitative analysis of depolarization-induced ATP release from mouse brain synaptosomes: external calcium dependent and independent process. *J. Memb. Biol.* 127 (1): 21-33.
- Flynn, M.P., Martin, M.C., Moore, P.T., Stafford, J.A., Fleming, G.A., Phang, J.M. (1989). Type II hyperprolinaemia in a pedigree of Irish travellers (nomads). *Arch. Dis. Child.* 64: 1699-1707.
- Flynn, N.E., Meininger, C.J., Haynes, T.E., Wu, G. (2002). The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomed. Pharmacother.* 56: 427-438.
- Fonnum, F. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 42: 1-11.

- Forman, H.J., Boveris, A. (1982). Superoxide radical and hydrogen peroxide in mitochondria. In: Pryor, W.A. (Ed.). *Free radicals in biology*. San Diego, Academic Press, pp. 65-90.
- Fossi, M.C., Leonzio, C., Massi, A., Lari, L., Casini, S. (1992). Serum esterase inhibition in birds: a nondestructive biomarker to assess organophosphorus and carbamate contamination. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23: 99-104.
- Franzon, R., Lamers, M.L., Stefanello, F.M., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., Wyse, A.T.S. (2003). Evidence that oxidative stress is involved in the inhibitory effect of proline on Na⁺,K⁺-ATPase activity in synaptic plasma membrane of rat hippocampus. *Int. J. Dev. Neurosci.* 21: 303-307.
- Freeman, B., Crapo, J.D. (1982). *Biology of disease: Free radicals and tissue injury*. *Lab. Invest.* 47: 412-426.
- Fremeau, R.T., Caron, M.G., Blakely, R.D. (1992). Molecular cloning and expression of a high affinity L-proline transporter expressed in putative glutamatergic pathways of rat brain. *Neuron* 8: 915- 926.
- Furuta, A., Torhstein, J.D., Martin, L.J. (1997). Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J. Neurosci.* 1 (17): 8363– 8375.
- Gayle, R.B., Maliszewski, C.R., Gimpel, S.D., Schoenborn, M.A., Caspary, R.G., Richards, C., Bracel, K., Price, V., Drosopoulos, J.H., Islam, N., Alyonycheva, T.N., Broekman, M.J., Marcus, A.J. (1998). Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto- ADPase/CD39. *J. Clin. Invest.* 101: 1851–1859.
- Geula, C., Darvesh, S. (2004). Butyrylcholinesterase, cholinergic neurotransmission and the pathology of Alzheimer's disease. *Drugs Today.* 40: 711-21.
- Giacobini, E. (2000). In: Giacobini, E (Ed.). *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors*. pp. 181-226.
- Giacobini, E. (2003). Cholinesterases: New Roles in Brain Function and in Alzheimer's Disease. *Neurochem. Res.* 28: 515-522.
- Gilbert, D.L. (2000). Fifty years of radical ideas. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 899: 1.

- Giugliani, R. (1988). Erros inatos do metabolismo: uma visão panorâmica. *Pediatria Moderna* Vol. XXIII. 1: 29-40.
- Goodman, S.I., Mace, J.W., Miles, B.S., Teng, C.C., Brown, S.B. (1974). Defective hydroxyproline metabolism in type II hyperprolinaemia. *Biochem. Med.* 10: 329-336.
- Grisar, T. (1984). Glial and neuronal Na⁺-K⁺ pump in epilepsy. *Ann. Neurol.* 16: S128-S134.
- Gupta, R.C., Milatovic, D., Dettbarn, W.D. (2002). Depletion of energy metabolites following acetylcholinesterase inhibitor-induced status epilepticus: protection by antioxidants. *Neurotoxicology* 22: 271-282.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2000). *Free radicals in biology and medicine*. New York, Oxford University Press Inc., 3rd edition.
- 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: 1634–1658.
- Hansen, O., Clausen, T. (1988). Quantitative determination of Na⁺-K⁺-ATPase and other sarcolemmal components in muscle cells. *Am. J. Physiol.* 254: C1-C7.
- 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.
- Hirai, H. (2000). Clustering of delta glutamate receptors is regulated by the actin cytoskeleton in the dendritic spines of cultured rat Purkinje cells. *Eur. J. Neurosci.* 12: 563–570.

- Inestrosa, N.C., Perelman, A. (1990). Association of acetylcholinesterase with the cell surface. *J. Membr. Biol.* 118: 1-9.
- Ingram, E.M., Wiseman, J.W., Shoshi, T., Emson, P.C. (2001). Reduction of glial glutamate transporters in the parietal cortex and hippocampus of EL mouse. *J. Neurochem.* 79: 564–575.
- Izquierdo, I. (1988). Organização, consolidação, construção e reconstrução da memória. Rio de Janeiro, Editora UFRGS.
- Izquierdo, I. (1989). Different forms of post-training memory processing. *Beh. Neural Biol.* 51: 171-202.
- Jain, S.K., Mc Vie, R., Smith, T. (2000). Vitamin E supplementation restores glutathione and malondialdehyde to normal concentrations in erythrocytes of type 1 diabetic children. *Diab. Care.* 23: 1389-1394.
- 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., Siegel, 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.
- Kanai, Y., Hediger, M.A. (1992). Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360: 467–471.
- 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.
- Kegel, B., Braun, N., Heine, P., Maliszewski, C.R., Zimmermann, H. (1997). An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacology* 36: 1189-1200.
- Kurella, E.G., Tyulina, O.V., Boldyrev, A.A. (1999). Oxidative resistance of Na/K-ATPase. *Cell. Mol. Neurobiol.* 19: 133-140.

- Kurihara, H., Hashimoto, K., Kano, M., Takayama, C., Sakimura, K., Mishina, M., Inoue, Y., Watanabe, M. (1997). Impaired parallel fiber_Purkinje cell synapse stabilization during cerebellar development of mutant mice lacking the glutamate receptor delta 2 subunit. *J. Neurosci.* 17: 9613–9623.
- Lane, R.M., Potkin, S.G., Enz, A. (2005). Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 9(1): 101-124.
- 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.
- Lent, R. (2002a). Processamento de informação e transmissão de mensagens através das sinapses. Em: Cem bilhões de neurônios. Conceitos fundamentais de neurociência. São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte, Ed. Atheneu. cap. 4, pp. 97-132.
- Lent, R. (2002b). As bases neurais da memória e da aprendizagem. Em: Cem bilhões de neurônios. Conceitos fundamentais de neurociência. São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte, Ed. Atheneu. cap. 18, pp. 587-617.
- 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.
- Liu, P., Bilkey, D.K. (1998). Perirhinal cortex contributions to performance in the Morris water maze. *Behav. Neurosci.* 112: 304-315.
- Lockridge, O. (1988). Structure of human serum cholinesterase. *BioEssays* 9: 125-128.

- Lynch, MA. (2004). Long-Term Potentiation and Memory. *Physiol. Rev.* 84: 87–136.
- Mack, A., Robitzki, A. (2000). The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5' butyrylcholinesterase-DNA study. *Prog. Neurobiol.* 60: 607-628.
- Maggirwar, S.B., Dhanraj, D.N., Somani, S.M., Rankumar, V. (1994). Adenosine acts an endogenous activator of the cellular antioxidant defense system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201: 508-515.
- Maragakis, N.J., Rothstein, J.D. (2001). Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch. Neurol.* 58: 365– 370.
- Maragakis, N.J., Rothstein, J.D. (2004). Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. *Neurobiol. Dis.* 15: 461–473.
- Marcus, A.J., Broekman, M.J., Drosopoulos, J.H., Islam, N., Alyonycheva, T.N., Safier, L.B., Hajjar, K.A., Posnett, D.N., Schoenborn, M.A., Schooley, K.A., Gayle, R.B., Maliszewski, C.R. (1997). The endothelial cell ecto- ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J. Clin. Invest.* 99: 1351–1360.
- Marshall, W.J., Bangert, S.K. (1995). Free Radicals. In: *Metabolic and Clinical Aspects. Clin. Biochem.* 765-777.
- Marshall, J.M. (2000). Adenosine and muscle vasodilatation in acute systemic hypoxia. *Acta Physiol. Scand.* 168: 561-573.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Vallete, F.M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.* 41: 31-91.
- Massoulié, J. (2002). The original of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals* 11: 130-143.
- Mateo, J., Harden, T.K., Boyer, J.L. (1999). Functional expression of cDNA encoding a human ecto-ATPase. *Br. J. Pharmacol.* 128: 396-402.
- Matés, J.M., Pérez-Gómez, C., Castro, I.N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 32: 595-603.
- Mattson, M.P., Chan, S.L., Duan, W. (2002). Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior. *Phys. Rev.* 82: 637– 672.

- Mayat, E., Petralia, R.S., Wang, Y.X., Wenthold, R.J. (1995). Immunoprecipitation, immunoblotting, and immunocytochemistry studies suggest that glutamate receptor delta subunits form novel postsynaptic receptor complexes. *J. Neurosci.* 15: 2533–2546.
- McGaugh, J.L. (1996). Time-dependent process in memory storage. *Science* 153: 1351-1358.
- McGaugh, J.L. (2000). Memory - a century of consolidation. *Science* 287: 248-251.
- Mecocci, P., Mariani, E., Cornacchiola, V., Polidori, M.C. (2004). Antioxidants for the treatment of mild cognitive impairment. *Neurol. Res.* 26: 598-602.
- Meldrum, B.S. (1994). The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. *Neurology* 44: S14– S23.
- Meldrum, B.S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* 130: 1007S–1015S.
- Melo, J.B., Agostinho, P., Oliveira, C.R. (2003). Involvement of oxidative stress in the enhancement of acetylcholinesterase activity induced by amyloid beta-peptide. *Neurosci. Res.* 45: 117-127
- Mesulam, M.-M., Guillozet, A., Shaw, P., Levey, A., Duysen, E.G., Lockridge, O. (2002). Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* 110: 627-639.
- Milatovic, D., Zivin, M., Gupta, R.C., Dettbarn, W.D. (2001). Alterations in cytochrome c oxidase activity and energy metabolites in response to kainic acid-induced status epilepticus. *Brain Res.* 31: 67-78.
- Moreira, J.C.F., Wannmacher, C.M.D., Costa, S.M., Wajner, M. (1989). Effect of proline administration on rat behavior in aversive and nonaversive tasks. *Pharmac. Biochem. & Behav.* 32: 885-890.
- Morel, P., Tallineau, C., Pontcharraud, R., Piriou, A., Huguet, F. (1999). Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na⁺/K⁺ATPase in rat striatal synaptosomes. *Neurochem. Int.* 33: 531-540.

- 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.
- Myhrer, T. (2003). Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res. Rev.* 41: 268–287
- Nadler, J.V. (1987). Sodium-dependent proline uptake in the rat hippocampal formation: association with ipsilateral-commissural projections of CA3 pyramidal cells. *J. Neurochem.* 49: 1155-1160.
- Nadler, J.V., Bray, S.D., Evenson, D.A. (1992). Autoradiographic localization of proline uptake in excitatory hippocampal pathways. *Hippocampus* 2: 269-278.
- Niki, E., Noguchi, N., Gotoh, N. (1993). Dynamics of lipid peroxidation and its inhibition by antioxidants. *Biochem. Soc. Trans.*, 21: 313-317.
- O’Brien, K.K., Saxby, B.K., Ballard, C.G., Grace, J., Harrington, F., Ford, G.A., O’Brien, J.T., Swan, A.G., Fairbairn, A.F., Wesnes, K., del Ser, T., Edwardson, J.A., Morris, C.M., McKeith, I.G. (2003). Regulation of attention and response to therapy in dementia by butyrylcholinesterase. *Pharmacogenetics* 13: 231-239.
- Olney, J.W., Collins, R.C., Sloviter, R.S. (1986). Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage. *Adv. Neurol.* 44: 857- 877.
- Olton, D.S., Markowska, A.L. (1994). Memory and hippocampal function as targets for neurotoxic substances. *Neurotoxicology* 15: 439-443.
- 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.
- Ozawa, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 54: 581–618.

- Perry, E.K., Tomlinson, B.E., Blessed, G., Bergmann, K., Gibson, P.H., Perry, R.H. (1978). Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Br. Med. J.* 2: 1457-1459.
- Petersen, R.C., Smith, G.E., Waring, S.C., Ivnik, R.J., Tangalos, E.G., Kokmen, E. (1999). Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch. Neurol.* 56: 303-308.
- Phang, J.M., Yeh, G.C., Scriver, C.R. (1995). Disorders of proline and hydroxyproline metabolism. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York, McGraw-Hill, 7th ed., pp.1125-1146.
- Phang, J.M., Hu, C.A., Valle, D. (2001). Disorders of proline and hydroxyproline metabolism. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York, McGraw-Hill, 8th ed., pp. 1821-1838.
- Pines, G., Danbolt, N.C., Bjoras, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E., Kanner, B.L. (1992). Cloning and expression of rat brain l-glutamate transporter. *Nature* 360: 464–467.
- Pontes Z.L., Oliveira L.S., Bavaresco C.S., Streck E.L., Dutra-Filho C.S., Wajner M., Wannmacher C.M.D., Wyse A.T.S. (1999). Proline administration decreases (Na⁺,K⁺)-ATPase activity in the synaptic plasma membrane from cerebral cortex of rats. *Metab. Brain Dis.* 14: 265-272.
- Pontes, Z.L., Oliveira, L.S., Franzon, R., Wajner, M., Wannmacher, C.M.D., Wyse, A.T.S. (2001). Inhibition of (Na⁺,K⁺)-ATPase activity from rat hippocampus by proline. *Neurochem. Res.* 26: 1321-1326.
- Poyton, R.O., McEwen, J.E. (1996). Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 563-607.
- Praticò, D., Delanty, N. (2000). Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. *Am. J. Med.* 109: 577-585.
- Quillfeldt, J. A. (1994). O papel dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA na expressão da memória no córtex entorrinal e estruturas relacionadas. Tese de

Doutorado do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS.

- Ralevic V, Burnstock G. (2003). Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. *Drug News Perspect.* 16: 133-40.
- Rauchová, H., Drahotá, Z., Koudelová, J. (1999). The role of membrane fluidity changes and thiobarbituric acid-reactive substances production in the inhibition of cerebral cortex Na⁺/K⁺-ATPase activity. *Physiol. Res.* 48: 73-78.
- Reis, E.A., Zugno, A.I., Franzon, R., Tagliari, B., Matte, C., Lammers, M.L., Netto, C.A., Wyse, A.T. (2002). Pretreatment with vitamins E and C prevent the impairment of memory caused by homocysteine administration in rats. *Metab. Brain Dis.* 17: 211-217.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Cabrera, J., D'Arpa, D., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Ramos, S. (1999). The oxidant/antioxidant network: role of melatonin. *Biol. Sig. Recept.* 8: 56-63.
- 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.
- Renick, S.E., Kleven, D.T., Chan, J., Stenius, K., Milner, T.A., Pickel, V.M., Fremeau, R.T. Jr. (1999). The mammalian brain high-affinity L-proline transporter is enriched preferentially in synaptic vesicles in a subpopulation of excitatory nerve terminals in rat forebrain. *J. Neurosci.* 19: 21-33.
- 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.
- Rhoads, D.E., Peterson, N.A., Raghupathy, E. (1983). Selective inhibition of synaptosomal proline uptake by leucine and methionine enkephalins. *J. Biol. Chem.* 258: 12233-12237.

- 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.
- Roof, R.L., Zhang, Q., Glasier, M.M., Stein, D.G. (1993). Gender-specific impairment on Morris water maze task after entorhinal cortex lesion. *Behav. Brain Res*. 57: 47-51.
- Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., Kunczi, R.W. (1994). Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13: 713– 725.
- Salvador, M., Henriques, J.A.P. (2004). *Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo*. Canoas, RS: Editora da Ulbra, 1ª edição.
- Sano, M., Ernesto, C., Thomas, R.G., Klauber, M.R., Schafer, S., Grundman, M., Woodbury, P., Growdon, J., Cotman, C.W., Pfeiffer, E., Schneider, L.S., Thal, L.J. (1997). A controlled trial of selegiline, α -tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *New Engl. J. Med*. 336: 1216-1222.
- Schetinger, M.R.C., Bonan, C.D., Schierholt, R.C., Webber, A., Arteni, N., Emanuelli, T., Dias, R.D., Sarkis, J.J.F., Netto, C.A. (1998). Nucleotide hydrolysis in rats submitted to global cerebral ischemia: a possible link between preconditioning and adenosine production. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis*. 7: 281-286.
- Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. eds. (2001). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York, McGraw –Hill, Inc., 8th ed.
- Segovia, G., Porrás, A., Del Arco, A., Mora, F. (2001). Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech. Ageing Dev*. 122: 1– 29.
- Sener, G., Sehirli, A.O., Ipci, Y., Cetinel, S., Cikler, E., Gedik, N., Alican, I. (2005). Taurine treatment protects against chronic nicotine-induced oxidative changes. *Fundam. Clin. Pharmacol*. 19: 155–164.
- 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., Davoodi-Semiromi, 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.
- Silva, R.H., Abilio, V.C., Takatsu, A.L., Kameda, S.R., Grassl, C., Chehin, A.B., Medrano, W.A., Calzavara, M.B., Registro, S., Andersen, M.L., Machado, R.B., Carvalho, R.C., Ribeiro, R. de A., Tufik, S., Frussa-Filho, R. (2004). Role of hippocampal oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation in mice. *Neuropharmacology* 46: 895-903.
- Silver, A. (1974). *The biology of cholinesterases*. Elsevier, Amsterdam.
- Siqueira, I.R., Fochesatto, C., Andrade, A., Santos, M., Hagen, M., Bello-Klein, A., Netto, C.A. (2005). Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. *Int. J. Devl. Neuroscience.* 23: 663-671.
- 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). Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1386: 65-78.
- Squire, L.R., Knowlton, B., Musen, G. (1993). The structure and organization of memory. *Ann. Rev. Psychol.* 44: 453-495.
- Squire, L.R. (2004). Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiol. Learn. Mem.* 82: 171-177.
- Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K., Stoffel, W. (1992). Structure, expression, and functional analysis of a Na⁺-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Neurobiology* 89: 10955–10959.
- Takemoto, Y. (2004). L-proline microinjected into the rat ventrolateral medulla induces a depressor response distinct from L-glutamate. *Jpn. J. Physiol.* 54: 339–345.
- Taysi, S., Polat, F., Gul, M., Sari, R.A., Bakan, E. (2002). Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 21: 200-204.

- Todorov, L.D., Mihaylova-Todorova, S., Westfall, T.D., Sneddon, P., Kennedy, C., Bjur, R.A., Westfall, D.P. (1997). Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. *Nature* 387: 76–79.
- Travacio, M., Llesuy, S. (1996). Antioxidant enzymes and their modification under oxidative stress conditions. *Free Rad. Res. Latin Amer.* 48: 9-13.
- Tsakiris, S., Angelogianni, P., Schulpis, K.H., Stavridis, J.C. (2000). Protective effect of L-phenylalanine on rat brain acetylcholinesterase inhibition induced by free radicals. *Clin. Biochem.* 33: 103-106.
- Ullensvang, K., Lehre, K.P., Styorm-Mathisen, J., Danbolt, N.C. (1997). Differential developmental expression of the two rat brain glutamate transporter proteins GLAST and GLT. *Eur. J. Neurosci.* 9: 1646–1655.
- Van Harreveld, A., Fifková, E. (1973). Effects of amino acids on the isolated chicken retina, and on its response to glutamate stimulation. *J. Neurochem.* 20: 947-962.
- 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): 25-27.
- 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.
- Wang, T.F., Guidotti, G. (1996). CD39 is an ecto-(Ca²⁺, Mg²⁺)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 271: 9898-9901.
- Wang, T.F., Rosenberg, P.A., Guidotti, G. (1997). Characterization of brain ecto-ATPase: evidence for only one ecto-ATPase (CD39) gene. *Mol. Brain Res.* 47: 295-302.
- Warren, I. (2002). Facilitating infant adaptation: the nursery environment. *Semin. Neonatol.* 7: 459–467.

- Wenk, G.L., Parsons, C.G., Danysz, W. (2006). Potential role of N-methyl-D-aspartate receptors as executors of neurodegeneration resulting from diverse insults: focus on memantine. *Behav. Pharmacol.* 17: 411-424.
- Wheller, K.P., Walker, J.A., Barker, D.M. (1975). Lipid requirement of the membrane sodium-plus-potassium ion-dependent adenosine triphosphatase system. *Biochem. J.* 146: 713-722.
- Wu, G., Flynn, N.E., Flynn, S.P., Jolly, C.A., Davis, P.K. (1999). Dietary protein or arginine deficiency impairs constitutive and inducible nitric oxide synthesis by young rats. *J. Nutr.* 129: 1347.
- Wyse, A.T.S., Sarkis, J.J.F., Cunha-Filho, J.S., Teixeira, M.V., Schetinger, M.R., Wajner, M., Wannmacher, C.M.D. (1994). Effect of phenylalanine and its metabolites on ATP- diphosphohydrolase activity in synaptosomes from rat cerebral cortex. *Neurochem. Res.* 19: 1175-1180.
- Wyse, A.T.S., Sarkis, J.J., Cunha-Filho, J.S., Teixeira, M.V., Schetinger, M.R., Wajner, M., Wannmacher, C.M.D. (1995). ATP diphosphohydrolase activity in synaptosomes from cerebral cortex of rats subjected to chemically induced phenylketonuria. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28: 643-9.
- 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.
- Yang, J., Lam, E.W., Hammad, H.M., Oberley, T.D., Oberley, L.W. (2002). Antioxidant enzyme levels in oral squamous cell carcinoma and normal human oral epithelium. *J. Oral. Pathol. Med.* 31: 71-77.
- 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.

- Zhao, H.M., Wenthold, R.J., Wang, Y.X., Petralia, R.S. (1997). Delta-glutamate receptors are differentially distributed at parallel and climbing fiber synapses on Purkinje cells. *J. Neurochem.* 68: 1041–1052.
- Zimmermann, H. (1996). Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases 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.