

PATRICIA DA COSTA MARISCO

**EFEITO DA AMÔNIA SOBRE AS
CONVULSÕES E A INIBIÇÃO DA
SUCINATO DESIDROGENASE INDUZIDAS
POR ÁCIDO METILMALÔNICO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

UFRGS

PORTO ALEGRE, RS, BRASIL

2001

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

EFEITO DA AMÔNIA SOBRE AS CONVULSÕES E A
INIBIÇÃO DA SUCINATO DESIDROGENASE
INDUZIDAS POR ÁCIDO METILMALÔNICO

PATRICIA DA COSTA MARISCO

Orientador

Prof. Dr. CARLOS FERNANDO DE MELLO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em Convênio Interinstitucional – UFRGS – UFSM – URCAMP, como requisito parcial para a obtenção do grau de **MESTRE EM BIOQUÍMICA**.

PORTO ALEGRE, RS, BRASIL

2001

A vida sem riscos é morta! Sem desafios o cérebro dorme.

José Ângelo Gaiarsa

*Essa dissertação é dedicada a minha querida mãe,
Maria Lúcia da Costa Marisco
“Por ser uma guerreira e nunca ter desistido.”
Pelo amor, dedicação e apoio.*

AGRADECIMENTOS

À Deus sobre tudo pela vida, tanto a “nossa” quanto a dos ratos.

Aos ratos que “humildemente” cederam as suas vidas à ciência para o bem da “humanidade”: o meu carinho, o meu respeito e o meu muito obrigada.

Ao grupo da bioquímica que tão calorosamente acolheu-me e que sempre me apoiou.

Ao meu amigo e orientador Professor Carlos Fernando de Mello, pela amizade, alegria, incentivo e sobretudo pela “paciência”.

Ao meu eterno companheiro Jedison, pelo grande amor que recebi durante todos estes anos. Pela sua dedicação, pelo incentivo na hora certa, pelo puxão de orelha, enfim, pela sua EXISTÊNCIA.

À minha mãe guerreira que me ensinou a dignidade, os princípios da honra, da honestidade, da persistência e pelo exemplo de vida. Por ter-me dado todas as condições para que eu pudesse chegar aqui e principalmente por ter acreditado nisso. Enfim, por nunca ter desistido.

À minha sogra, Dona Zaira, com certeza minha segunda mãe, que com muito carinho e orgulho sempre me engrandeceu.

Ao meu querido vô Oristil que mesmo sem saber é o meu ídolo.

Às minhas irmãs, cunhados e sobrinhos, pelo orgulho.

À Eliza, pela grande amizade, pelo ombro amigo, pelo carinho, pelo “ouvido”.

À minha grande amiga Luciana, pela amizade sincera, pelo apoio incondicional, pela paciência, por acreditar em mim, por tudo.

À Ju Bonini, pelo imenso carinho, à Ju Fleck pelo companheirismo, à Marinei pelo braço direito, à Keli pela parceria, à Valéria pela “força”. Ao Fernando e ao Ricardo pela alegria, ao Gami e ao Telmo, pelo apoio, à Michele pela ajuda de toda hora ... enfim a todo o grupo, por que de alguma forma todos me ajudaram. No entanto, é impossível citar um por um. Obrigada a todos.

À Maribel e todo o seu grupo, pela amizade e ajuda.

Aos meus colegas Valério, Adriana, Taciana, Neusa e Alfério pela parceria.

Aos professores, pelo muito que nos ensinaram.

Às minhas colegas da Hemato-oncologia que muito me incentivaram.

À todos os meus amigos queridos que sempre tiveram uma palavra de carinho na hora certa.

RESUMO

A hiperamonemia é um achado comum em crianças com acidemia metilmalônica, um erro inato do metabolismo caracterizado por retardo mental, convulsões e acúmulo tecidual de ácido metilmalônico (MMA). Embora existam evidências de que o MMA induza convulsões por inibição da succinato desidrogenase (SDH), muito pouco se sabe sobre a contribuição da hiperamonemia para o desenvolvimento das convulsões nestes pacientes. No presente estudo investigou-se os efeitos do acetato de amônio sobre a ação convulsivante do MMA *in vivo* e do cloreto de amônio sobre a inibição da SDH estriatal induzida pelo MMA *in vitro*. Ratos adultos foram injetados com acetato de amônio (1,5 mmol/kg, s.c.) ou acetato de sódio (1,5 mmol/kg, s.c.) e, após 5 minutos, injetados unilateralmente no estriado com MMA (3 µmol/µl) neutralizado para pH 7,4 com NaOH ou NaCl (4,5 µmol/µl). O pré-tratamento com acetato de amônio aumentou o número e durações dos episódios convulsivos induzidos pelo MMA. O cloreto de amônio não teve efeito sobre a atividade da succinato desidrogenase e não alterou a inibição da SDH induzida pelo MMA *in vitro*. Estes resultados sugerem que a amônia potencializa os efeitos comportamentais induzidos pelo MMA por mecanismos que não envolvam adicional inibição da SDH. Este estudo provê evidências de que a hiperamonemia pode potencializar os efeitos neurotóxicos do MMA.

ABSTRACT

Hyperammonemia is a common finding in children with methylmalonic acidemia, an inherited metabolic disease characterized by mental retardation, convulsions and accumulation of methylmalonic acid (MMA). Although it has been suggested that MMA induces convulsions through succinate dehydrogenase (SDH) inhibition, very little is known about the contribution of hyperammonemia for the development of convulsions in these patients. In the present study the effects of ammonium ions on the convulsant action of MMA and on MMA-induced inhibition of striatal succinate dehydrogenase were investigated. Adult rats were injected with ammonium acetate (1.5 mmol/kg, s.c.) or sodium acetate (1.5 mmol/kg), followed 5 min later by buffered MMA (3 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$) or NaCl (4.5 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$) injected into the striatum. Ammonium acetate pretreatment increased the number and duration of convulsive episodes elicited by MMA. Ammonium chloride had no effect on basal succinate dehydrogenase activity and did not alter MMA-induced inhibition of SDH *in vitro*. These results suggest that ammonia potentiates MMA-induced behavioral effects through a mechanism which does not involve further succinate dehydrogenase inhibition. This study provides evidence that hyperammonemia may potentiate the neurotoxic effects of MMA.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Acidemia Metilmalônica	1
1.1.1 Metabolismo do Propionato	4
1.1.2 Efeitos do MMA sobre o Metabolismo Intermediário	5
1.1.2.1 Inibição metabólica na acidemia metilmalônica	7
1.2. Hiperamonemia	14
1.2.1 Hiperamonemia na acidemia metilmalônica	14
1.2.2 Características e concentração de amônia nos líquidos biológicos	16
1.2.3 Mecanismos propostos para a toxicidade da amônia	18
1.2.3.1 Toxicidade mediada por receptores glutamatérgicos do tipo NMDA	18
1.2.3.2 Efeito da amônia sobre o metabolismo energético	21
1.2.3.3 A amônia aumenta a produção de radicais livres	26
1.2.3.4 Alterações nas funções de neurotransmissores	26
1.2.3.5 Prejuízo aos mecanismos de neuroproteção endógenos	31
1.2.3.6 Alterações funcionais e patológicas dos astrócitos e neurônios	31
1.2.3.7 Alterações na morfologia da barreira hemato-encefálica e nos sistemas carreadores	34
1.2.3.8 Efeitos da amônia sobre os vasos sanguíneos e sobre o fluxo sanguíneo	35
1.2.3.9 Efeitos da amônia sobre as propriedades eletrofisiológicas das células do SNC	36
1.2.3.10 Efeitos da amônia sobre o pH celular	38
1.3. Succinato Desidrogenase	41
1.3.1 Inibidores da atividade da SDH	44

1.3.2	Ativadores da atividade da SDH _____	44
2.	OBJETIVOS _____	46
3.	MATERIAL E MÉTODOS _____	47
3.1.	Reagentes _____	47
3.2.	Soluções _____	48
3.2.1	Comassie Blue _____	48
3.2.2	Tampão de homogeneização: _____	49
3.2.3	Solução de ácido metilmalônico pH 7,4 _____	49
3.2.4	Solução de ácido succínico 333 mM pH 7,0 _____	49
3.2.5	Solução de albumina _____	49
3.2.6	Solução de cianeto de potássio 122,5 mM _____	49
3.2.7	Solução de cloreto de amônio _____	50
3.2.8	Solução de cloreto de potássio _____	50
3.2.9	Solução de diclorofenolindofenol (DCIP) 1,7 mM _____	50
3.2.10	Solução de fenasina metassulfato 7,5 mM _____	50
3.2.11	Solução de rotenona 30 µg/ml _____	50
3.2.12	Solução salina-sacarose, pH 7,2 _____	50
3.2.13	Tampão fosfato 150 mM pH 7,5 _____	51
3.3.	Equipamentos _____	51
3.4.	Amostra _____	52
3.4.1	Avaliação comportamental _____	52
3.4.2	Avaliação bioquímica _____	53
3.4.2.1	Preparação da fração enriquecida em mitocôndrias _____	53
3.4.2.2	Padronização do método utilizado para determinação da atividade da SDH _____	54
3.4.2.3	Determinação da atividade da succinato desidrogenase in vitro _____	54
3.5.	Análise estatística _____	55
4.	RESULTADOS _____	56
4.1.	Avaliação comportamental _____	56
4.1.1	Efeito da amônia sobre o número e duração dos episódios convulsivos induzidos pelo MMA _____	56
4.1.2	Efeito da amônia sobre o número de rotações contralaterais _____	58
4.2.	Avaliação bioquímica _____	59

4.2.1	Padronização do método utilizado para determinação da atividade da SDH _____	59
4.2.1.1	Determinação da quantidade de proteína _____	59
4.2.1.2	Determinação da concentração de DCIP _____	60
4.2.1.3	Determinação da concentração de fenasina _____	61
4.2.2	Determinação da atividade da succinato desidrogenase in vitro _____	62
4.2.2.1	Efeito do MMA sobre a atividade da SDH _____	62
4.2.2.2	Efeito do KCl e NH ₄ Cl sobre a atividade da SDH ____	63
4.2.2.3	Efeito da amônia sobre o efeito inibidor do MMA sobre a SDH	64
5.	CONCLUSÕES _____	67
6.	DISCUSSÃO _____	68
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	76
8.	ANEXO _____	101

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Metabolismo da propionil-CoA: metabólitos, enzimas e cofatores _____ 2
- Figura 2** - Célula em condições normais _____ 9
- Figura 3** - Alterações provavelmente induzidas pela presença do MMA inibidor da SDH _____ 12
- Figura 4** – Efeito do propionil CoA, dos ésteres de CoA e do MMA sobre a síntese da uréia _____ 15
- Figura 5** – Reação de equilíbrio da amônia no sangue _____ 17
- Figura 6** - Interferência da amônia no funcionamento do Ciclo de Krebs e síntese de glutamina _____
22
- Figura 7** – Inibição causada pela amônia na atividade da lançadeira malato-aspartato _____
24
- Figura 8** – Reação da glutamina sintetase _____
39
- Figura 9** - Efeito do acetato de amônio (1,5 mmol/Kg; s.c.) sobre o número dos episódios convulsivos induzidos pelo MMA (3 μ mol) __ 56
- Figura 10** - Efeito do acetato de amônio (1,5 mmol/Kg; s.c.) sobre a duração dos episódios convulsivos induzidos pelo MMA (3 μ mol) __ 57
- Figura 11** - Efeito o acetato de amônio (1,5 mmol/Kg; s.c.) sobre o

número de rotações contralaterais induzidas pelo MMA (3 μmol)__58

Figura 12 - Efeito da quantidade de proteína no meio reacional sobre a velocidade de redução do DCIP _____59

Figura 13 - Efeito da concentração de DCIP sobre a linearidade da reação na determinação da atividade da SDH _____ 60

Figura 14 - Efeito da concentração de fenasina metassulfato sobre a atividade da SDH e sua inibição induzida pelo MMA _____61

Figura 15 - Efeito do MMA sobre a atividade da SDH _____62

Figura 16 - Efeito do KCl e NH_4Cl sobre a atividade da SDH _____63

Figura 17 - Efeito de 0,1 mM de cloreto de amônio sobre o efeito inibidor do MMA sobre a atividade da SDH _____64

Figura 18 - Efeito de 1 mM de cloreto de amônio sobre o efeito inibidor do MMA sobre a atividade da SDH _____65

Figura 19 - Efeito de 10 mM cloreto de amônio sobre o efeito inibidor do MMA sobre a atividade da SDH _____66

LISTA DE ABREVIATURAS

- AcNa₂ – acetato de sódio
- ADN – ácido desóxi-ribonucleico
- AMPA - ácido DL- α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazole-propiónico
- ATP – adenosina 5'-trifosfato
- CO₂ – dióxido de carbono
- DCIP – 2,6-diclorofenolindofenol
- GABA - ácido γ -aminobutírico
- HCl – ácido clorídrico
- HCO₃⁻ – íon bicarbonato
- KCl – cloreto de potássio
- KCN - cianeto de potásio
- KOH – hidróxido de potássio
- L-NAME – N-nitro-L-arginina metil ester
- MK-801 – dizocilpina
- MMA – ácido metilmalônico
- NaBR – brometo de sódio
- NaCl – cloreto de sódio
- NaClO₄ – perclorato de sódio
- NaOH – hidróxido de sódio
- NH₃ – amônia
- NH₄⁺ - íon amônio
- NH₄Cl- cloreto de amônio
- NMDA - N-metil-D-aspartato

NO^\bullet - óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintetase

O_2^\bullet - radical superóxido

OH^\bullet - radical hidroxila

ONOO^- - peroxinitrito

PKC – proteína quinase

SDH – succinato desidrogenase

SNC – sistema nervoso central

TRIS – tris(hidroximetil)-aminometano

1. INTRODUÇÃO

1.1. Acidemia Metilmalônica

A acidemia metilmalônica foi descrita pela primeira vez por Berhoolzer et al. em 1967, quando investigavam crianças que apresentavam profunda cetoacidose metabólica e retardo no desenvolvimento, com elevadas quantidades de ácido metilmalônico (MMA) no sangue e na urina. A acidemia metilmalônica é um erro inato do metabolismo autossômico recessivo caracterizado por acúmulo tecidual de ácido metilmalônico e de outros metabólitos secundários como propionato, metilcitrato, β -OH-propionato e cetonas de cadeia longa, devido à deficiência na atividade da enzima metilmalonil-CoA mutase (EC 5.4.99.2) (Liver, 1995). Esta enzima faz parte da rota de degradação do propionato e promove a conversão do L-metilmalonil CoA a succinil-CoA (figura 1).

A produção aumentada de ácido metilmalônico leva à acidose metabólica (Anton & Rosemberg, 1995). Os sinais e sintomas da doença variam em gravidade, de acordo com a idade que se instala o distúrbio metabólico. Quando o quadro se instala precocemente (até 21 dias) o paciente geralmente vai ao óbito, e apresenta maior morbidade (Fier et al., 1990).

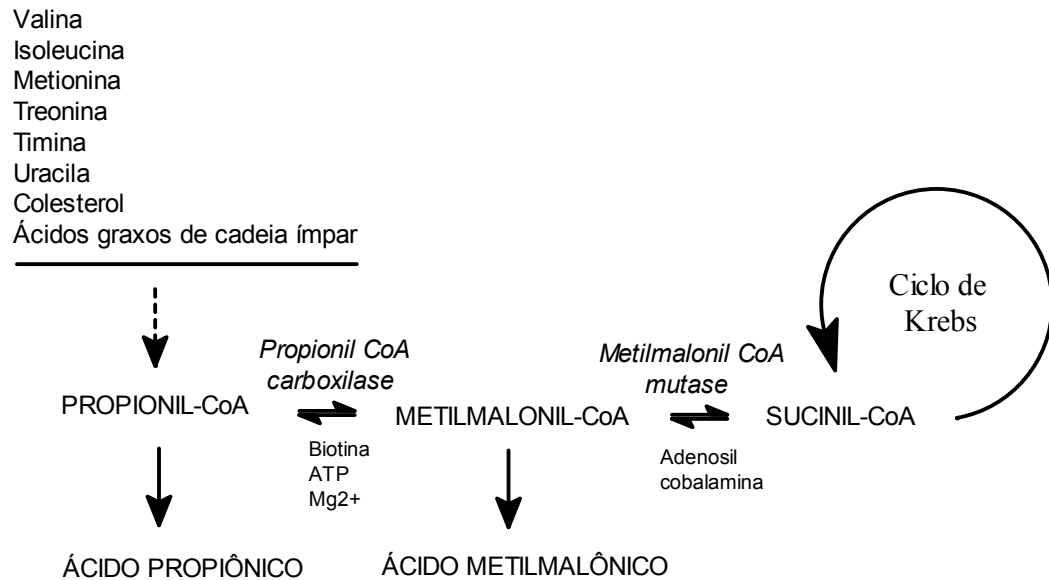


Figura 1 - Metabolismo da propionil-CoA: metabólitos, enzimas e cofatores. O passo que envolve a conversão de D-metilmalonil-CoA em L-metilmalonil-CoA, catalisado pela metilmalonil-CoA racemase foi suprimido, da mesma forma que o bicarbonato utilizado pela propionil-CoA carboxilase, por motivos de clareza (modificado de Fenton e Rosenberg, 1995).

O quadro laboratorial caracteriza-se, principalmente, por acidose metabólica, hipercetonemia, hiperamonemia, hipoglicemia, hiperglicinemia, neutropenia e trombocitopenia (Fenton & Rosenberg, 1995). Os pacientes que sobrevivem (menos de 15% no período de dois anos) apresentam convulsões, retardo mental e psicomotor, além de alterações comportamentais, e neuropsiquiátricas, tais como déficit de atenção, quadros de agressividade e comportamento autista (Dutra, 1992). O tônus muscular apresenta-se geralmente comprometido, e a hipotonia se acentua após crises de descompensação metabólica. Quando a instalação do distúrbio ocorre tardiamente (2 a 24 meses de vida) os pacientes apresentam um

prognóstico melhor, tanto do ponto de vista da morbidade como da mortalidade. As alterações metabólicas são menos intensas que as observadas no início precoce e variam, desde ausência de comprometimento neurológico até cetoacidose leve e ataxia (Ehler & Meier et al., 1994).

Os pacientes podem apresentar alterações morfológicas no sistema nervoso central como edema da substância branca nas primeiras semanas, podendo evoluir para um aumento no volume ventricular, desmielinização e degeneração dos núcleos da base (Ehler & Ozand, 1994).

Os níveis sanguíneos de MMA, quase indetectáveis em pessoas normais, passam a ser encontrados próximos de 2,9 mM (34 mg/dl) nos pacientes afetados, e a excreção deste metabólito, que normalmente não ultrapassa a 5 mg (0,04 mmol) em 24 horas, passa a ser de 240 a 5700 mg (2,1 a 49 mmol) em 24 horas (Scriver, 1995). A concentração de MMA no líquido céfalo-raquidiano, nos poucos pacientes onde foi dosada, demonstrou-se ser equivalente a do plasma (Fenton & Rosenberg, 1995).

Os pacientes que apresentam formas mais brandas da doença ou a forma benigna possuem níveis séricos muito mais baixos de MMA, particularmente quando assintomáticos clinicamente (Scriver, 1995).

1.1.1 Metabolismo do Propionato

A maior parte do propionato utilizado por animais não-ruminantes provém do metabolismo lipídico e protéico. O catabolismo de alguns aminoácidos como a isoleucina, metionina, treonina e valina leva à formação de propionil CoA. Segundo [Compton et al. \(1990\)](#) o catabolismo destes aminoácidos contribui com aproximadamente 50% do propionato formado em pacientes com erros inatos do metabolismo do metilmalonato e propionato. Outras fontes geradoras de propionil CoA são as rotas de degradação das bases nitrogenadas timina e uracila, e de ácidos graxos de cadeia com número ímpar de átomos de carbono. A degradação da cadeia lateral do colesterol também contribui para a formação de propionil CoA, porém de forma quase insignificante em relação às demais fontes do mesmo ([Nielsen, 1963](#)). Alguns trabalhos sugerem que as bactérias intestinais contribuem na formação de propionil CoA, e esta contribuição parece ser um fator importante no acúmulo de propionato em pacientes portadores de alterações na rota de degradação deste composto, podendo esta contribuição ser superior a 20% ([Compton et al., 1990](#)).

O propionil CoA é convertido a succinil CoA seguindo três reações enzimáticas consecutivas (figura 1). Na primeira, o propionil CoA é carboxilado a D-metilmalonil CoA pela propionil CoA carboxilase (EC 6.4.1.3) que utiliza bicarbonato e ATP, tendo como cofatores biotina e magnésio. O D-metilmalonil CoA é convertido a L-metilmalonil CoA pela enzima metilmalonil CoA racemase (EC 5.1.99.1). Na terceira reação, a metilmalonil CoA mutase (EC

5.4.99.2) catalisa a isomerização do L-metilmalonil CoA a succinil CoA, onde o grupo carboxila SCoA é transferido através de uma isomerização intramolecular de C-2 para C-3. O succinil CoA, por sua vez, pode entrar no ciclo de Krebs, onde sofrerá oxidação (Hnninger, 1995).

As deficiências na atividade da metilmalonil CoA mutase podem ser decorrentes de alterações na apoenzima, deficiência de cobalamina ou das enzimas responsáveis pelo metabolismo do cofator. O metabolismo da cobalamina e suas alterações podem ser revisados em Hinton & Rosemberg, 1995.

1.1.2 Efeitos do MMA sobre o Metabolismo Intermediário

A deficiência na atividade da metilmalonil CoA mutase leva ao acúmulo de L- metilmalonil CoA que, por tiólise transforma-se em ácido metilmalônico, o principal metabólito acumulado na acidemia metilmalônica. No entanto, outras alterações bioquímicas são encontradas na doença, tais como hipoglicemia, hipercetonemia, hiperamonemia, hiperglicinemia e deficiência na síntese de ácidos graxos (Hinton & Rosemberg, 1995).

Mer, em 1970, demonstrou que a piruvato carboxilase é inibida por metilmalonil CoA, sugerindo que a gliconeogênese hepática pode estar comprometida pelos elevados índices de MMA, assim como sua contribuição para a manutenção da glicemia. Além disso, foi demonstrado que MMA inibe o transporte mitocondrial de malato, sugerindo mais um ponto de inibição possível para a gliconeogênese

(Halperin et al., 1971).

O MMA parece afetar o metabolismo dos corpos cetônicos, e a hipercetonemia observada na doença parece estar relacionada à menor utilização da acetil CoA, devido à inibição nas atividades das enzimas citrato sintetase, aconitase e isocitrato desidrogenase pelo metilcitrato, um metabólito que se acumula na doença (Eido et al., 1971; Eema-Dhadli et al., 1975).

A síntese de ácidos graxos no sistema nervoso e fígado de animais lactentes é feita a partir de corpos cetônicos. O passo inicial desta síntese é conversão de β -OH-butirato em acetoacetato pela β -OH-butirato desidrogenase. O MMA inibe competitivamente esta enzima em vários tecidos (Eh et al., 1975; Eel et al., 1976 e Etra et al., 1993), causando uma diminuição na síntese de ácidos graxos por redução na disponibilidade de fonte de carbonos para este fim. Também foi demonstrado por Edinale et al. em 1970 que o metilmalonil Coa inibe a incorporação de acetil CoA e malonil CoA em ácidos graxos em fígado de ratos, além deste próprio metabólito ser incorporado nas porções terminais das moléculas resultando ácidos graxos saturados e ramificados, cuja alterações estruturais poderiam afetar o funcionamento das células, como as propriedades da membrana celular. Enkel et al. em 1973 observaram que o metilmalonil CoA era capaz de inibir as atividades da acetil CoA carboxilase e da sintetase de ácidos graxos em fígado e sistema nervoso de ratos deficientes em vitamina B₁₂, relacionando assim a diminuição na síntese de ácidos graxos ao acúmulo dos diferentes metabólitos comuns na acidemia metilmalônica.

Segundo [Elman & Otto \(1974\)](#), uma das possíveis causas para a hiperglicinemia observada parece ser a inibição da enzima de clivagem da glicina em CO_2 e NH_3 por tiglato e isoleucina, metabólitos que se encontram em concentrações elevadas na acidemia metilmalônica.

O acúmulo de amônia na acidemia metilmalônica será detalhadamente abordado mais adiante no item hiperamonemia.

1.1.2.1 Inibição metabólica na acidemia metilmalônica

Em [Dutra et al.](#) demonstraram que o MMA é capaz de inibir a succinato desidrogenase (SDH) e a β -OH-butilato desidrogenase cerebral *in vitro*. [Jiner et al.](#), em 1992, observaram que este ácido reduz a produção de CO_2 e aumenta a produção de lactato pelo cérebro. As diminuições nas atividades da succinato desidrogenase e β -OH-butilato desidrogenase causadas pelo MMA parecem estar relacionadas à redução da utilização de glicose e β -OH-butilato por prismas cerebrais de ratos em jejum verificadas na presença deste ácido ([Dutra et al.](#), 1989; 1991). Em [§2](#), [Hayasaka et al.](#) observaram que pacientes com acidemia metilmalônica ou propiônica, em acidose, apresentavam uma redução de até 70% da atividade da enzima citocromo oxidase, sem, contudo, descobrirem a causa direta do achado. A partir destes achados tem sido postulado que o MMA possa causar interferência no metabolismo aeróbico celular, levando provavelmente à uma diminuição na produção de ATP.

A depleção de ATP tem sido associada à excitotoxicidade (Bene et al., 1993; Billner et al., 1994; Bene & Greenamyre, 1995; Bessel & Sonnewald, 1995; McNaught et al., 1995; Benow et al., 1995; Bvalk et al., 1995) e ao dano celular oxidativo pela formação de radicais livres, e parece estar intimamente relacionada à patogênese de diferentes doenças neurodegenerativas (Byle & Puttfarcken, 1993; Jenner, 1994; Bulz & Beal, 1995; Schulz et al., 1995), incluindo esclerose lateral amiotrófica (Mitakis & Constantakakis, 1993; Hstein et al., 1993), mal de Parkinson (Jenner, 1994; McNaught et al., 1995), doença de Alzheimer (Jenner, 1994; Morris et al., 1995) e coréia de Huntington (Jenner, 1994; Bpton & Rosemberg, 1994; Bdolph et al., 1993; Bms et al., 1995).

Quando as células se encontram em condições normais os níveis de ATP disponíveis são suficientes para manter os gradientes iônicos e a polarização da membrana (figura 2).

Um bloqueio na fosforilação oxidativa ocasiona redução nos níveis de ATP (figura 3), e como consequência, despolarização neuronal parcial por falência de várias ATPases que mantêm o gradiente de íons através das membranas celulares, principalmente da Na^+ , K^+ -ATPase (Bthanson et al., 1995). A despolarização da membrana leva à saída do Mg^{2+} , que bloqueia o canal do receptor glutamatérgico subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA) de uma maneira voltagem-dependente, e permite a entrada de íons, particularmente Na^+ e Ca^{++} para o meio intracelular (BDonald & Schoepp, 1993).

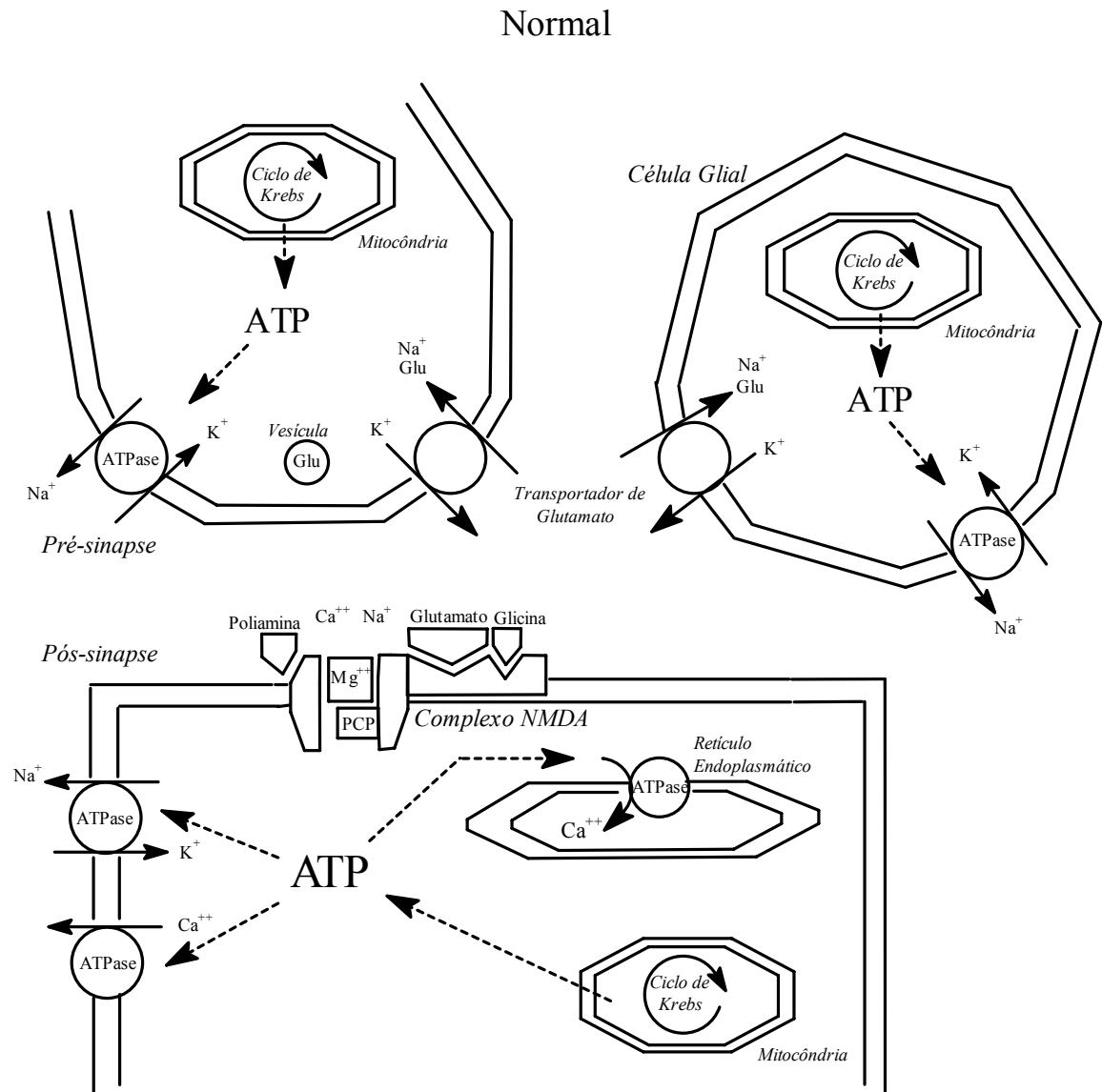


Figura 2 - Célula em condições normais. O ATP disponível celular é suficiente para manter funcionantes as ATPases que mantêm os gradientes iônicos e a polarização da membrana. O gradiente de Na^+ estabelecido pela Na^+ , K^+ -ATPase possibilita o funcionamento do transportador de glutamato neuronal e glial, deixando as concentrações extracelulares deste aminoácido baixas. O complexo NMDA está com o canal fechado pela presença de Mg^{2+} , que é mantido de maneira voltagem-dependente.

A entrada de Na^+ parece ser a responsável pelo edema celular que se verifica nos estágios iniciais do chamado dano excitotóxico, e ocorre principalmente através de canais associados a outro subtipo de receptores glutamatérgicos, denominados AMPA-Kainato (porque liga o ácido DL- α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazole-propiónico) (Chan et al., 1979). O aumento na concentração celular de Ca^{++} leva à ativação de enzimas dependentes deste íon envolvidas no fenômeno de neurotoxicidade, incluindo calpaína (Purson et al., 1995), fosfolipase C (Nemura et al., 1992), proteína quinase C (Fithman, 1992; Vlakovic et al., 1995), calcineurina (Mstrong, 1989; Snyder & Sabatini, 1995) e a óxido nítrico sintetase, que produz NO^\bullet (Snyder e Bredt, 1992). O NO^\bullet parece interagir com radicais superóxido (O_2^\bullet) e formar peroxinitrito (ONOO^-). Este radical pode difundir-se para o meio intra, ou extracelular e então promover a oxidação de lipídios, proteínas e DNA (Beckman et al., 1990). Além disso, o peroxinitrito pode produzir íons nitrônio, os quais são capazes de nitrificar resíduos de tirosina e de gerar OH^- através da decomposição de sua forma protonada (ONOOH) (Beckman et al., 1990; Chiropoulos et al., 1992). O aumento na concentração intramitocondrial de O_2^\bullet , da mesma forma que o prejuízo no fluxo de elétrons através da cadeia respiratória resulta em oxidação incompleta do oxigênio e a formação de O_2^\bullet (Eckens, 1994). Além destes mecanismos de lesão celular envolvendo a despolarização da membrana pós-sináptica, a depleção de ATP leva ao aumento na liberação de glutamato através de mecanismos dependentes de cálcio e pela inibição e/ou reversão de mecanismos de recaptção deste aminoácido excitatório na pré-

sinapse (Eidl & Burgesser, 1993). O aumento na concentração extracelular de glutamato ativa os receptores glutamatérgicos subtipo NMDA e AMPA/kainato e como consequência ocorrem os fenômenos celulares descritos acima.

As células gliais também são afetadas pela inibição do metabolismo aeróbico, e podem contribuir para o aumento do glutamato extracelular através da diminuição e/ou reversão da recaptação do glutamato (Eimba et al., 1994). Como consequência do comprometimento do metabolismo energético ocorre, nos astrócitos e neurônios, um processo de acidose intracelular devido ao acúmulo de lactato neste meio, sendo que este é capaz de inibir a recaptação de glutamato de astrócitos em cultura. Além disso, a diminuição do pH intracelular é capaz de inibir a recaptação do glutamato mesmo na presença de níveis teciduais normais de ATP, e contribuir para o dano excitotóxico (Eanson et al., 1995).

Vários inibidores metabólicos são capazes de induzir lesão celular através de mecanismos que envolvem o glutamato, particularmente o receptor subtipo NMDA. Entre eles podemos citar a rotenona, cianeto, oxi-aminoacetato, 3-nitropropionato e malonato; estes últimos inibidores da succinato desidrogenase, como o MMA (EDonald & Schoepp, 1993; Ebuillet et al., 1994; Eevalk et al., 1995; Eghrens et al., 1995, Elakovic et al., 1995).

Falência Energética (presença de MMA)

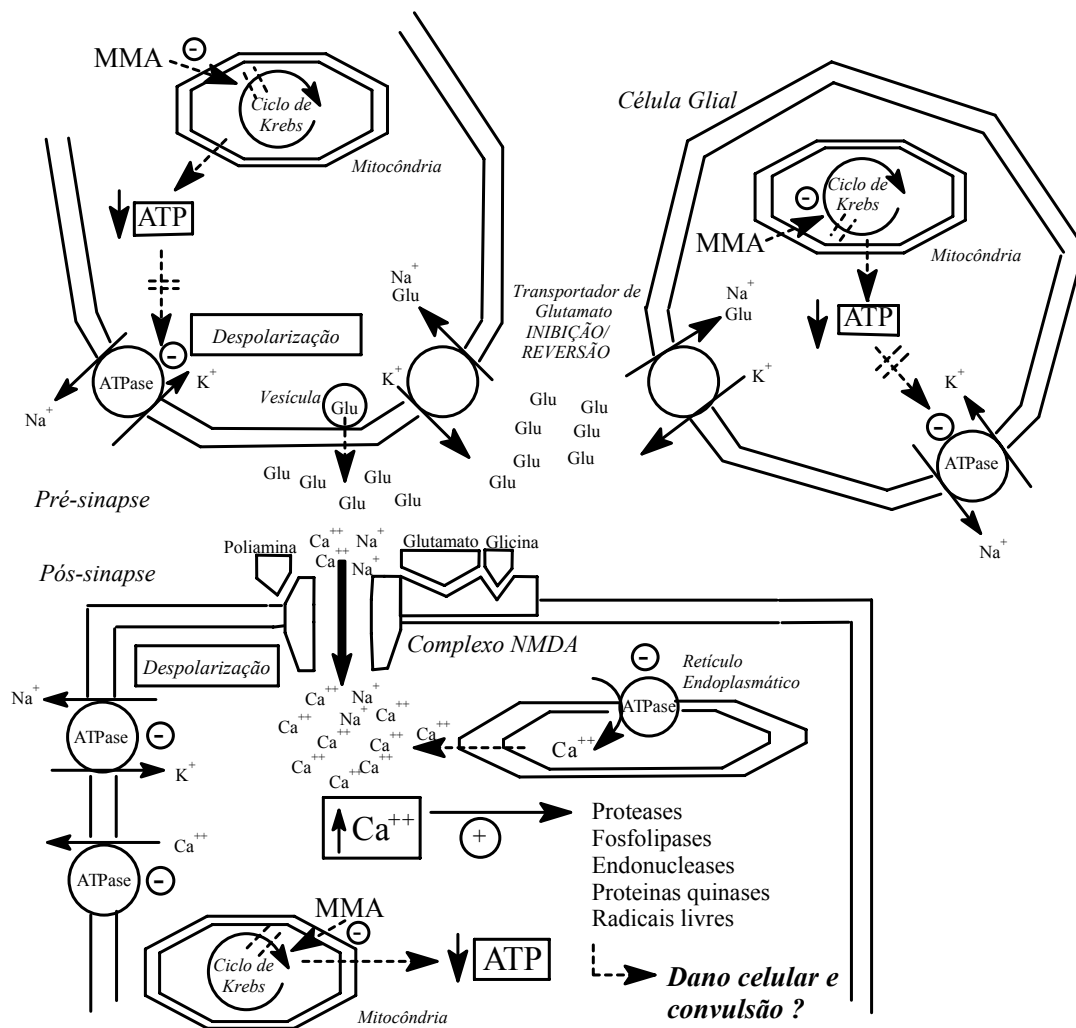


Figura 3 - Alterações provavelmente induzidas pela presença do MMA, inibidor da SDH. A inibição da SDH neuronal e glial causa depleção de ATP. A depleção de ATP leva à falência das ATPases, causando despolarização neuronal e alterações nos gradientes iônicos. A despolarização provoca a liberação de glutamato armazenado em vesículas sinápticas, e o desaparecimento do gradiente iônico leva à inibição e reversão dos transportadores responsáveis pela recaptação do glutamato a nível neuronal e glial, que resulta no aumento da concentração de glutamato no compartimento extracelular, que se liga ao receptor NMDA. A falência energética atinge também a pós-sinapse, causando despolarização e saída do Mg^{2+} que impedia o fluxo de Ca^{2+} e Na^{+} através do canal NMDA, além de inibição da Ca^{2+} -ATPase do retículo endoplasmático, levando a um aumento na concentração intracelular desse cátion divalente. O aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} ativa proteases, fosfolipases, endonucleases, proteínas quinase e a formação de radicais livres, provavelmente envolvidos na propagação do foco de despolarização, e na gênese da convulsão; e talvez em dano celular.

Além disso, o padrão das lesões no SNC causadas pela

administração sistêmica do 3-NPA em ratos e pela intoxicação acidental em humanos é, morfológicamente, semelhante àquelas observadas em pacientes portadores de acidemia metilmalônica, no que diz respeito ao comprometimento seletivo dos núcleos da base (Erdolph et al., 1992; Erdolph et al., 1993; Ertan & Rosenberg, 1995). A administração de MMA intra-estriatal causa convulsões em ratos adultos, e estas convulsões são inibidas por MK-801 e atenuadas por succinato, sugerindo o envolvimento de receptores NMDA, e provavelmente da inibição da SDH nas convulsões induzidas por este ácido orgânico (Mello et al., 1996). As convulsões induzidas por MMA são igualmente atenuadas pela administração de antioxidantes, como a vitamina C e a vitamina E (Figuera et al., 1999), e recentemente foi demonstrado que o MMA induz formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico *in vitro* e reduz a capacidade antioxidante total do sistema nervoso, confirmando que a presença de MMA induz a formação de radicais livres (Fontella et al., 2000).

1.2. Hiperamonemia

A amônia é uma substância proveniente do metabolismo dos compostos nitrogenados, sendo produto e/ou precursor de importantes compostos (Muninger, 1995). Este metabólito possui um papel importante na manutenção da homeostase do nitrogênio nos organismos vivos, mas quando se acumula em altas concentrações se torna extremamente tóxico, principalmente para o sistema nervoso central (Soper & Plum, 1987).

1.2.1 Hiperamonemia na acidemia metilmalônica

A hiperamonemia é um dos principais achados na acidemia metilmalônica afetando 70% dos pacientes (Liver, 1995) e está associada a uma diminuição no funcionamento do ciclo da uréia (figura 4). Segundo Jude et al. (1979) e Glasgow & Chase (1976), o propionil CoA, um dos principais metabólitos acumulados na acidemia metilmalônica, inibe competitivamente a síntese de N-acetilglutamato a partir de acetil CoA. O N-acetilglutamato é um ativador alostérico da carbamil fosfato sintetase, a enzima responsável pelo primeiro passo do ciclo da uréia. Um bloqueio na síntese da uréia resulta num acúmulo de amônia justificando a hiperamonemia apresentada por estes pacientes. Além disso, segundo Anton & Rosenberg (1995), a própria inibição da carbamil fosfato sintetase I por ésteres de CoA pode causar hiperamonemia. No entanto, em 1980, Stewart & Walser postularam que a causa da hiperamonemia em ratos

tratados com MMA era mais complexa, uma vez que o aumento verificado nos níveis de aspartato e citrulina sugerem que o MMA possa exercer efeito inibitório sobre a argininosuccinato sintetase. Portanto ainda são necessários estudos complementares para elucidar os eventos responsáveis pela hiperamonemia apresentada por estes pacientes.

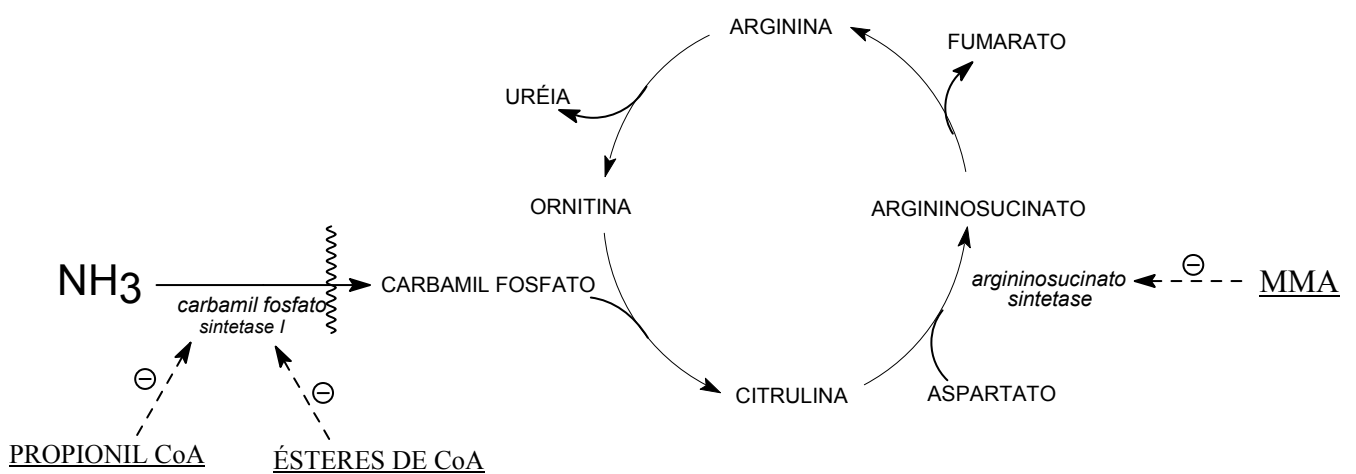


Figura 4 – Efeito do propionil CoA, dos ésteres de CoA e do MMA sobre a síntese da uréia. Na acidemia metilmalônica a hiperamonemia está associada a uma diminuição no ciclo da uréia. O propionil CoA inibe competitivamente a síntese de N-acetilglutamato, um ativador alostérico da carbamil fosfato sintetase I, comprometendo este passo do ciclo. Os ésteres de CoA inibem diretamente a carbamil fosfato sintetase I. O MMA inibe a argininosuccinato sintetase.

A hiperamonemia é causa primária de neurotoxicidade em uma gama de patologias, particularmente aquelas associadas à insuficiência hepática (Meltzer & Bare, 1996; Stewart & Walser, 1980), levando a dificuldades motoras, alterações comportamentais, convulsões, coma e

morte. Além disso, os pacientes que possuem níveis séricos elevados de amônia podem apresentar diarreia, vômitos e acidose metabólica (Smeltzer & Bare, 1996).

Os mecanismos de neurotoxicidade da amônia ainda não estão bem esclarecidos. Contudo, existem evidências de que os distúrbios provocados pela amônia no SNC sejam decorrentes da combinação de alterações bioquímicas, morfológicas, energéticas e fisico-químicas, tais como alterações no pH celular e conseqüentes modificações na estrutura celular, principalmente nos astrócitos (Kinska et al., 1996, Lewes & Leino, 1985; Remberg et al., 1991); alterações no metabolismo de alguns neurotransmissores (Felipo et al., 1994; Wu et al., 1999; Cooper & Plum, 1987, Sisman et al., 1992); produção de radicais livres (Kosenko et al., 1999); possível depleção de alguns intermediários do ciclo de Krebs (Cooper & Plum, 1987) e, em última instância, de ATP (Cooper & Plum, 1987; Felipo et al., 1994; Kosenko et al., 1994; Inakumari et al., 1995; Rcaida et al., 1996).

1.2.2 Características e concentração de amônia nos líquidos biológicos

É importante que se conheça como a amônia se comporta nos líquidos biológicos para que se compreenda os mecanismos pelos quais este composto causa efeitos deletérios ao organismo.

A amônia é uma base orgânica forte que possui pKa de 9,1-9,2

a 37 °C (Cooper & Plum, 1987). A forma protonada de amônia (NH₄⁺) é um ácido fraco e a forma não protonada (NH₃) é uma base forte. (Lehninger, 1995).

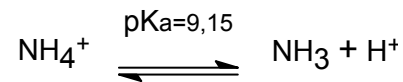


Figura 5 – Reação de equilíbrio da amônia no sangue. A amônia é uma base orgânica forte que possui o pKa de 9,1-9,2 a 37 °C.

Portanto, na corrente sanguínea humana onde o pH é 7,4, a maior parte da amônia (NH₃) se encontra na forma ionizada (NH₄⁺) (Lehninger, 1995). Apesar de a maioria da amônia gerada no catabolismo estar presente como NH₄⁺ em pH neutro, algumas reações produzem NH₃. Quando a NH₃ se encontra em concentrações excessivas ocorre uma alcalinização dos fluidos celulares (Lehninger, 1995).

Os níveis de amônia na corrente sanguínea podem flutuar rapidamente, fazendo com que uma simples determinação da sua concentração não seja um bom parâmetro para se definir a concentração real deste metabólito (Siegel et al., 1994).

1.2.3 Mecanismos propostos para a toxicidade da amônia

1.2.3.1 Toxicidade mediada por receptores glutamatérgicos do tipo

NMDA

Os eventos tóxicos provocados pela amônia parecem estar relacionados àqueles envolvidos na neurotoxicidade glutamatérgica, uma vez que concentrações elevadas de amônia induziram um aumento nos níveis extracelulares de glutamato (Muller et al., 1994; Wu et al., 1999; Sisman et al., 1992). Um aumento na concentração extracelular de glutamato pode resultar em ativação dos receptores NMDA, levando à abertura dos canais de íons a eles associados, permitindo o influxo neuronal de íons Ca^{2+} e Na^+ (Donald & Schoepp, 1993). O aumento intracelular de cálcio permite a ativação de algumas enzimas dependentes deste íon e de outros mecanismos que desencadeiam injúria neuronal (Brinson et al., 1995; Nemura et al., 1992; Thman, 1992; Vlakovic et al., 1995; Munstrong, 1989; Snyder & Sabatini, 1995; Snyder & Bredt, 1992).

De fato, existem várias evidências de que a neurotoxicidade da amônia se dá por mecanismos glutamatérgicos por meio de receptores NMDA. Segundo Garcia et al. (1992) e Senko et al. (1994) bloqueadores deste tipo de receptor, como o MK-801, previniram a morte e depleção de ATP induzida pela administração aguda de amônia em ratos. Porém, o MK-801 não previniu as alterações provocadas pela amônia nos níveis cerebrais de determinados metabólitos destes animais, como a diminuição no conteúdo de

glicogênio, corpos cetônicos e de glutamato. Tampouco previniu o aumento nos níveis de glicose e glutamina, porém previniu parcialmente o aumento nas concentrações de lactato e piruvato (Eipó et al., 1994). Partindo destes resultados, foi sugerido que o mecanismo de toxicidade da amônia não estava exclusivamente ligado aos efeitos mediados pelo receptor NMDA, mas que a ativação deste receptor era um passo essencial no processo que levava à depleção de ATP e morte dos animais. Embora o MK-801 não tenha prevenido as alterações no metabolismo energético citadas acima, ele previniu a morte destes animais e a depleção de ATP, sugerindo que as modificações nos níveis destes compostos não estavam diretamente relacionadas à morte e nem à depleção de ATP dos animais intoxicados pela amônia (Eipó et al., 1994; Esenko et al., 1995).

Além disso, Esenko et al. (1995) demonstraram que administração de compostos que previnem a toxicidade glutamatérgica do tipo NMDA, como os inibidores da enzima óxido nítrico sintetase, atenuaram a toxicidade e as alterações nos metabólitos cerebrais provocadas pela amônia. A nitroarginina, um inibidor da NOS, previniu parcialmente a morte dos animais e a depleção de ATP induzidas pela amônia. Além disso, previniu completamente o aumento no conteúdo da glicose, quase completamente o aumento de lactato e piruvato e, parcialmente, o decréscimo no conteúdo de glicogênio. No entanto, não previniu o aumento dos níveis de glutamina e diminuição de glutamato. Estes dados sugeriram o envolvimento da produção de óxido nítrico via ativação de receptores NMDA nos efeitos tóxicos causados pela amônia.

Um dos achados mais proeminentes nos estados de hiperamonemia é a depleção de ATP. Vários trabalhos tentaram elucidar a causa da depleção deste nucleotídeo ocorrida nestes estados. Recentemente foi proposto que a depleção de ATP na hiperamonemia é decorrente da ativação da enzima Na^+, K^+ -ATPase, induzida pela amônia (Lipp et al., 1994; Kosenko et al., 1994; Venkatesh et al., 1995). Com a ativação dos canais iônicos ligados a receptores ionotrópicos e sensíveis a voltagem, haveria um influxo de íons Na^+ e Ca^{+2} para o meio intracelular. Para a manutenção da homeostase, o excesso de Na^+ deve ser bombeado para fora da célula pela enzima Na^+, K^+ -ATPase, um processo que requer o consumo de ATP. A partir disso, foi sugerido que o aumento na atividade desta ATPase poderia ser responsável pela depleção de ATP observada na hiperamonemia. Lipp et al. (1994) demonstraram que a amônia induziu uma ativação da Na^+, K^+ -ATPase, e que o MK-801 previniu completamente este aumento na atividade desta enzima, indicando que este evento estava relacionado com ativação de receptores NMDA, e que poderia estar envolvido na depleção de ATP. Foi proposto que a amônia pudesse ter influência sobre a fosforilação desta ATPase pela proteína quinase C (PKC) ou sobre a a desfosforilação desta enzima por uma fosfatase. Como já havia sido descrito que a amônia diminuía a fosforilação mediada pela PKC da proteína MAP-2 associada aos microtúbulos (Lipp et al., 1993) foi investigado se ocorreria diminuição deste processo também para esta ATPase. Foi verificado que na presença de um ativador da PKC a ativação que a amônia causava sobre a atividade da ATPase era completamente revertida,

indicando que a ativação era devido ao decréscimo da fosforilação mediada pela PKC da ATPase resultando, assim, numa ativação da ATPase e consequente depleção deste nucleotídeo.

1.2.3.2 Efeito da amônia sobre o metabolismo energético

A depleção de ATP pela amônia foi inicialmente associada à incorporação dos grupos amino ao α -cetogluturato, glutamato e glutamina, em uma sequência de reações que culminaria no consumo de ATP pela glutamina sintetase. Além do consumo de ATP pela glutamina sintetase, o seqüestro de α -cetogluturato provavelmente resultaria em interferência no funcionamento do ciclo de Krebs, já que este composto é um intermediário deste ciclo, diminuindo a produção de ATP e assim contribuindo para a depleção deste nucleotídeo (figura 6). Entretanto, alguns anos mais tarde, foi demonstrado que a depleção de ATP não estava associada a uma diminuição no conteúdo de α -cetogluturato em todas as regiões do cérebro (Mandfeld et al., 1977; Senko et al.; 1993, 1995). Com isso, dissociou-se a depleção de ATP da diminuição dos níveis de α -cetogluturato celular. Embora a redução nos níveis de α -cetogluturato em certas áreas do cérebro, ou em alguns tipos celulares, não possa ser excluída como causa da depleção de ATP, esta alteração bioquímica não explica a depleção generalizada de ATP cerebral observada na hiperamonemia.

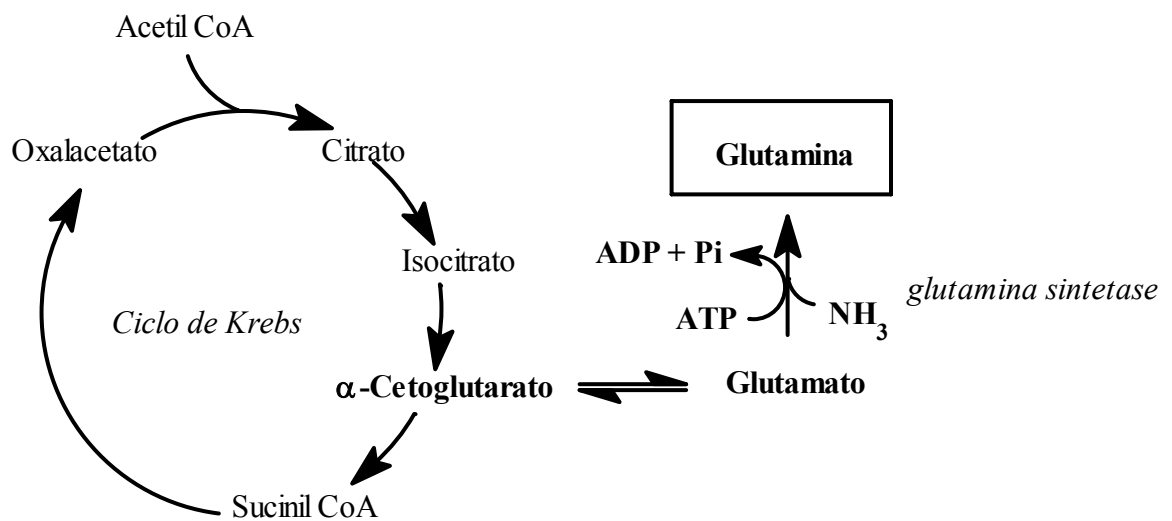



Figura 6 - Interferência da amônia no funcionamento do Ciclo de Krebs e síntese de glutamina. Na tentativa de detoxificar a amônia, os grupos amino são primeiramente incorporados ao α -cetoglutarato, um intermediário do Ciclo de Krebs, assim formando glutamato. Em seguida os grupos amino são incorporados ao glutamato para sintetizar glutamina em uma reação catalisada pela glutamina sintetase que consome ATP (Lehninger, 1995).

O enfraquecimento da hipótese da depleção de α -cetoglutarato, contudo, não invalidava a hipótese de queda nos níveis de ATP pelo alto consumo deste nucleotídeo pela enzima glutamina sintetase, uma vez que na hiperamonemia há uma alta taxa de produção de glutamina, que é o mecanismo pelo qual o tecido nervoso detoxifica a amônia (Lehninger, 1995) (figura 6). No entanto, senko et al. em 1994, demonstraram que o MK-801 previniu completamente a depleção de ATP induzida pela amônia, e acentuou o acúmulo de glutamina, sugerindo que a depleção do nucleotídeo não era decorrente do aumento na produção de glutamina.

Além das teorias já citadas para a depleção de ATP, alguns trabalhos demonstraram que a amônia influencia diretamente o funcionamento do ciclo de Krebs, uma vez que este composto inibe algumas enzimas importantes deste ciclo como a α -cetoglutarato desidrogenase. Em [Lai & Cooper](#) demonstraram que o complexo α -cetoglutarato desidrogenase cerebral de ratos era inibido por concentrações consideradas patológicas de amônia (0,2 a 2 mM). Segundo [Siegel](#) (1994) o excesso de amônia também inibiu a isocitrato desidrogenase em mitocôndrias de fígado de ratos, porém seu efeito sobre a enzima cerebral não era conhecido.

Uma outra hipótese sugeriu que a amônia pudesse causar uma inibição da lançadeira de elétrons malato-aspartato, uma vez que a diminuição nos níveis de glutamato total pode comprometer o funcionamento desta lançadeira pela diminuição do fluxo de elétrons, e conseqüente interferência no metabolismo oxidativo ([Patrick et al.](#), 1983). Segundo [Siegel et al.](#) (1994) ratos com hiperamonemia apresentaram as relações de lactato/piruvato e NADH/NAD⁺ citoplasmáticas aumentadas, indicando assim que podia existir um comprometimento no funcionamento da lançadeira de elétrons que possivelmente fosse devido a uma diminuição na translocação do glutamato-aspartato e pelo decréscimo nas atividades das aspartato aminotransferases, principalmente a mitocondrial (figura 7).

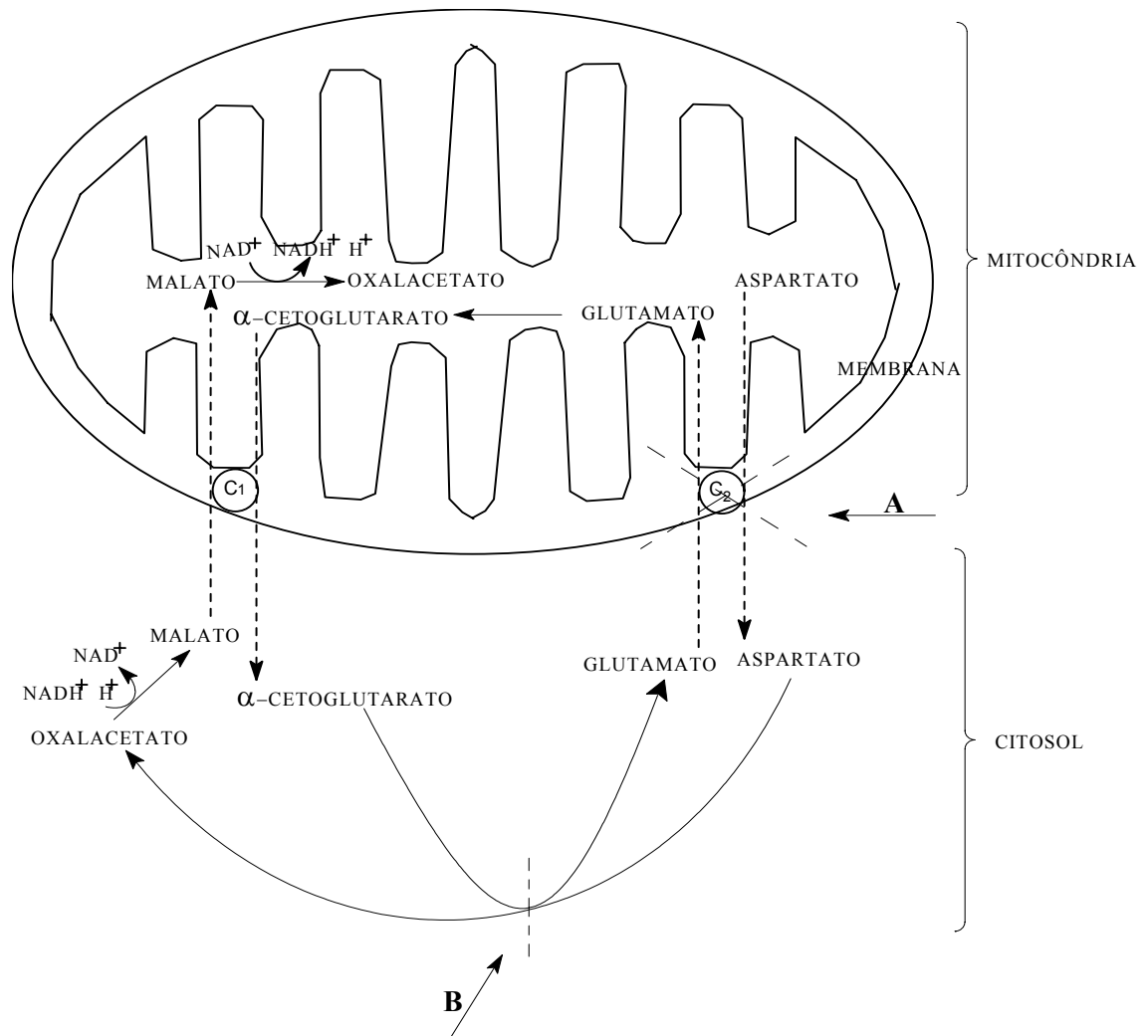


Figura 7 – Inibição causada pela amônia na atividade da lançadeira malato-aspartato. A amônia causa inibição da lançadeira de elétrons malato-aspartato pela diminuição na translocação do glutamato-aspartato através da membrana mitocondrial (A) e pelo decréscimo nas atividades das aspartato aminotransferases (B), principalmente a mitocondrial.

Além da interferência na produção de energia pela inibição do ciclo de Krebs, e do decréscimo no transporte de equivalentes reduzidos para a mitocôndria, foi verificado que a amônia interfere no metabolismo da glicose. Já em [Figura 1](#), Muntz & Hurwitz verificaram que a amônia estimulava a glicólise em extratos cerebrais. A partir

destes resultados os autores sugeriram que a amônia desinibia ou ativava a fosfofrutoquinase, uma das enzimas marca-passo da via glicolítica *in vivo* e *in vitro*. Tanto uma desinibição como uma ativação desta enzima pode estimular a utilização da glicose, fato esse observado em animais que apresentavam hiperamonemia aguda (Ewkins et al., 1973; Ehes et al., 1974). Em 1982 Eekwood et al. verificaram que em animais com hiperamonemia aguda existia diferenças na utilização da glicose nas diferentes áreas cerebrais. Segundo estes autores áreas como o tálamo e hipotálamo exibiam um aumento e o córtex exibiam uma redução na utilização. Já no que diz respeito à utilização da glicose pelo cérebro nas condições de hiperamonemia crônica, existe uma série de controvérsias entre os autores. Segundo Eiz & Duffy (1983) em condições de hiperamonemia crônica, primeiro existia uma ligeira diminuição na utilização da glicose e, depois de algumas semanas da instalação do quadro, havia um aumento significativo na utilização deste composto. Porém, Eens et al. em 1983, observaram que existia uma redução de cerca de 20% na utilização da glicose pelo cérebro de ratos com 4 a 8 semanas de hiperamonemia crônica. Apesar das contradições que existem no que diz respeito à utilização da glicose, é bem evidente que o excesso de amônia induz alterações no metabolismo da glicose.

Uma outra evidência que indicava a interferência da amônia sobre a glicólise, era o aumento nos níveis de lactato cerebral e da relação lactato/piruvato de animais hiperamonêmicos (Euffy et al., 1972; E et al., 1989).

1.2.3.3 A amônia aumenta a produção de radicais livres

Além dos mecanismos já descritos para a toxicidade da amônia, acredita-se que este composto cause prejuízos na função mitocondrial também por induzir um aumento na produção de radicais livres. Alguns estudos demonstraram que a amônia provocou uma diminuição na atividade das enzimas antioxidantes e aumento na produção de radicais superóxido no cérebro (Ssenko et al., 1997). Ssenko et al., em 1999, demonstraram que o bloqueio nos receptores glutamatérgicos tipo NMDA com MK-801 previniu o estresse oxidativo induzido pela amônia, sugerindo o envolvimento destes receptores na diminuição das defesas antioxidantes induzidas por níveis séricos de amônia elevados.

1.2.3.4 Alterações nas funções de neurotransmissores

O metabolismo da amônia está intimamente relacionado à síntese e turnover de alguns neurotransmissores, entre eles GABA (ácido γ -aminobutírico), aspartato e glutamato.

Vários estudos demonstram que a hiperamonemia alterou o metabolismo cerebral normal do glutamato, induzindo uma diminuição no conteúdo cerebral de glutamato e um aumento na concentração extracelular deste aminoácido (Hindfelt et al., 1977; Cooper & Plum, 1987; Butterworth et al., 1991; Felipo et al, 1994; Zhou et al., 1999).

Em 1977 Hindfelt et al. verificaram que a hiperamonemia

aguda em ratos causou uma diminuição no conteúdo cerebral de aspartato e que a progressão para o coma profundo era acompanhada de um progressivo aumento de alanina e diminuição de glutamato. Em 1994 Felipo et al. também demonstraram que a amônia diminuiu o conteúdo total de glutamato cerebral. Embora o decréscimo no conteúdo de glutamato tenha ocorrido usualmente de uma forma não muito acentuada (Cooper & Plum, 1987; Siegel et al., 1994), se as alterações nas quantidades deste aminoácido tivessem ocorrido em compartimentos específicos, tais como astrócitos e terminais sinápticos, poderiam ocorrer profundos efeitos fisiológicos em decorrência destas alterações. Sob este aspecto, Edford & Ward (1975; Edford & Ward, 1976) demonstraram que a glutamina era uma fonte de carbonos para o glutamato, e que concentrações de 1 mM de amônia inibiam a atividade da glutaminase em sinaptossomas. Baseando-se nestes achados, estes autores sugeriram que a inibição da atividade da glutaminase poderia contribuir para a depleção deste neurotransmissor nas terminações nervosas. A partir destes trabalhos foi proposto que os íons NH_4^+ tinham um efeito direto sobre o sistema glutamatérgico, diminuindo os níveis de glutamato nas terminações nervosas.

Apesar de o conteúdo total de glutamato no cérebro encontrar-se diminuído na hiperamonemia, a concentração extracelular de glutamato parecia elevada (Bosman et al., 1992). Isso provavelmente era devido ao aumento na liberação deste aminoácido (Butterworth et al., 1991), diminuição na sua recaptção pelos terminais sinápticos (Liu et al., 1999) e astrócitos ou por ambos mecanismos.

O processo de recaptção do glutamato liberado na fenda

sináptica pela transmissão do impulso nervoso é a principal forma pela qual é cessada a ação deste aminoácido excitatório neste local, e desencadeia a reciclagem do esqueleto de carbono deste neurotransmissor (Zhou et al., 1999). A recaptção é feita por vários transportadores dependentes de Na^+ , que possuem alta afinidade pelo glutamato. São conhecidos cinco subtipos de transportadores: EAAT1 (GLAST), EAAT2 (GLT-1), EAAT3 (EAAC1), EAAT4 E EAAT5. Estudos iniciais de hibridização *in situ* e imuno-histoquímica indicaram que GLAST e GLT-1 se encontram somente nos astrócitos, enquanto EAAC1 se encontram principalmente nos neurônios pós-sinápticos, e EAAT4 e EAAT5 estavam sendo identificados em neurônios do cerebelo e da retina, respectivamente. Mais recentemente, grandes quantidades de RNA mensageiro de GLT-1 têm sido identificadas nos neurônios, enquanto o transportador EAAC1 tem sido indentificado em astrócitos (Mendgenberg, 1998). Alguns estudos demonstraram que a amônia diminuiu os níveis do RNA mensageiro do transportador GLAST em culturas de astrócitos de várias áreas cerebrais, principalmente em astrócitos do estriado (Fujita et al., 1999). Estes resultados indicam que, na hiperamonemia, pode ocorrer falência na recaptção do glutamato pelas células gliais, o que certamente contribui para o aumento nos níveis extracelulares de glutamato.

Além das alterações no metabolismo do glutamato, a amônia também interfere no metabolismo de outros neurotransmissores como o GABA. Fencini et al. (1983; Fencini, 1984) demonstraram que a amônia produziu uma ativação do sistema GABAérgico e, em 1984, o mesmo

grupo demonstrou que coelhos com falência hepática apresentavam decréscimo na atividade da GABA transaminase cerebral, sugerindo que este achado provia evidência indireta de um decréscimo no *turnover* do GABA. Em 1979 [Emswiler et al.](#) encontraram níveis significativamente elevados de GABA em cérebros de animais com hiperamonemia. No entanto, [Emswiler et al.](#) (1979; 1990) demonstraram que a concentração intracelular de GABA encontrava-se diminuída em ratos com hiperamonemia, provavelmente pela diminuição na concentração intracelular de alguns de seus precursores ou pelo decréscimo da sua recaptação pela célula. Em 1992 Bosman et al. demonstraram que os níveis extracelulares de GABA não se encontravam elevados no líquido de diálise de córtex cerebral de ratos com hiperamonemia induzida. Como neste experimento não houve um aumento na concentração extracelular de GABA, estes autores explicaram o aumento na atividade GABAérgica como decorrência de uma alteração na densidade e ou afinidade destes receptores ou pela ocorrência de ligantes endógenos de receptores para benzodiazepinas ([Emswiler et al., 1988](#); [Emswiler et al., 1990](#)). No entanto, [Emswiler & Norenberg](#), em 2000, avaliaram a contribuição da amônia para as anormalidades na transmissão GABAérgica apresentadas pelos pacientes com encefalopatia hepática em culturas de astrócitos, já que estas parecem as células-alvo da neurotoxicidade da amônia. Estes autores demonstraram que, tanto o tratamento agudo como o crônico, com 5 mM de amônia, inibiram significativamente a recaptação de GABA com concomitante decréscimo do V_{max} e do K_m . Além disso, a amônia também induziu um aumento na liberação deste

neurotransmissor. A partir destes resultados, os autores sugeriram que estes efeitos da amônia sobre o GABA poderiam provocar uma elevação nos níveis extracelulares de GABA e assim contribuir para a disfunção na neurotransmissão GABAérgica.

Apesar de não existir consenso quanto às possíveis alterações nas quantidades de GABA, existe uma unanimidade por parte dos pesquisadores quanto à capacidade da hiperamonemia em causar disfunções na transmissão GABAérgica. Por fim, as evidências indicam que alterações nos níveis de GABA ou no seu metabolismo podem ter um importante papel na patogênese de alguns estados onde ocorre acúmulo de amônia.

Além das alterações nos neurotransmissores já descritos, alguns trabalhos investigaram as alterações no conteúdo e função da acetilcolina no cérebro. [Egança et al.](#), em 1953, observaram uma diminuição na síntese de acetilcolina em fatias de cérebros tratados com amônia. Outros dois trabalhos demonstraram diminuição na concentração cerebral de acetilcolina em animais que apresentavam convulsões induzidas pela amônia ([Kahashi et al.](#), 1961; [Cooper & Plum](#), 1987). Já [Elker et al.](#) (1971) não conseguiram demonstrar diminuições no conteúdo de acetilcolina em condições de hiperamonemia aguda e [Elker et al.](#) (1977) demonstraram que a indução de coma por intoxicação aguda pela amônia tem pequeno ou nenhum efeito sobre os níveis cerebrais de acetilcolina. Em 1968 [Yiyama et al.](#) demonstraram que a amônia inibiu a ligação de acetilcolina em sinaptossomas. Contudo, há quase um consenso na literatura de que as alterações colinérgicas observadas na

hiperamonemia não estão envolvidas na gênese das convulsões.

1.2.3.5 Prejuízo aos mecanismos de neuroproteção endógenos

A toxicidade da amônia tem sido relacionada com diversos fatores que prejudicam o funcionamento normal do SNC, entre eles estão incluídos os prejuízos causados aos mecanismos neuroproteção do organismo. O ácido quinurênico, um antagonista endógeno dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA e não NMDA, é um destes agentes neuroprotetores. Este ácido, sintetizado principalmente nos astrócitos a partir do seu precursor quinurenina, confere proteção às células do SNC e possui efeito anticonvulsivante (Eks et al., 1994). Em 8 Saran et al. demonstraram que a amônia provocou uma redução na síntese deste neuroprotetor causando, assim, um prejuízo neste mecanismo endógeno de neuroproteção. Ainda não estão bem esclarecidos os mecanismos pelos quais a amônia inibiu a síntese deste ácido, contudo acredita-se que seja decorrente da injúria celular que este metabólito provoca, principalmente nos astrócitos.

1.2.3.6 Alterações funcionais e patológicas dos astrócitos e neurônios


Embora as causas das disfunções neurológicas provocadas pela amônia ainda não sejam totalmente conhecidas, acredita-se que parte das alterações ocorridas nas células do sistema nervoso central seja decorrente, além das alterações já citadas, do acúmulo de água que ocorre nas condições de hiperamonemia. Os altos níveis de amônia

induzem um grande acúmulo mitocondrial de glutamina no cérebro (Ewins et al., 1996), um metabólito que promove retenção de água causando assim um edema celular que aparece principalmente nos astrócitos, embora algumas alterações possam ocorrer nos neurônios (Ewins & Leino, 1985; Fremberg et al., 1991).

Em 1985 Drewes e Leino demonstraram que a exposição aguda a amônia e ácido octanóico causou dano nos corpos celulares dos neurônios em preparações de cérebro de cães. As mitocôndrias dos neurônios se apresentaram alteradas e, apesar do edema, as mitocôndrias dos astrócitos pareciam normais. A partir destas observações, os autores concluíram que além dos astrócitos, os neurônios também podem sofrer alterações nas síndromes hiperamonêmicas e este fato pode ser relacionado aos mecanismos básicos da toxicidade da amônia.

Outro mecanismo proposto para as alterações celulares induzidas pela amônia foi sugerido por Ewins et al. em 2000. Estes autores observaram que a administração de amônia em ratos induziu importante alteração na homeostase de cálcio nas células do SNC, levando a um rápido aumento no conteúdo de cálcio intramitocondrial, seguido por uma redução na capacidade e na taxa de captação deste íon destas mitocôndrias, além de aumentar o efluxo espontâneo deste íon da mitocôndria para o citosol. Todos estes efeitos foram prevenidos pela administração de MK-801, indicando que os efeitos provocados pela amônia sobre a homeostase de cálcio eram decorrentes da ativação dos receptores NMDA. Além disso, para avaliar um possível envolvimento do poro de transição nos efeitos tóxicos provocados

pelo amônia, os autores verificaram que a administração de ciclosporina A, um inibidor da permeabilidade do poro de transição não alterou nenhum destes parâmetros, indicando que a permeabilidade do poro de transição não tinha um papel sobre o efluxo de cálcio nas condições estudadas.

Além destes, a amônia parece alterar as células do SNC também por outros mecanismos.  zanska et al. em 2000 sugeriram que este composto pudesse ter seus efeitos danosos sobre as células nervosas por meio da indução do fenômeno de apoptose. Em culturas destas células os efeitos deste composto pareciam ser parcialmente mediados pela estimulação de alguns supostos mecanismos sinalizantes característicos do programa de apoptose. Estes autores verificaram que em culturas de células C6 de glioma, concentrações de 5 e 10 mM induziram apoptose em 50% das células em 96 horas de exposição. Já, em 3-6 horas de exposição, se verificou a primeira transdução de sinal supostamente envolvida na apoptose, a ativação da PKC $\alpha\beta$. Além disso, coincidentemente com pronunciada manifestação de apoptose (em 72 horas e mais ainda em 96 horas) foi observado um aumento na transferência do fator de transcrição NF κ B do citoplasma para o núcleo. Quando o meio de cultura foi tratado com L-NAME, um inibidor da óxido nítrico sintetase, houve uma marcada redução no número de células com apoptose, indicando que o óxido nítrico parecia estar envolvido no processo. Estes resultados sugeriram que os efeitos tóxicos causados pela amônia sobre as células do SNC poderiam ser resultantes de uma complexa interrelação de pelo menos três moléculas sinalizadoras, supostamente envolvidas no fenômeno

de apoptose, o óxido nítrico, PKC e transcrição do fator NFκB.

1.2.3.7 Alterações na morfologia da barreira hemato-encefálica e nos sistemas carreadores

Na hiperamonemia as propriedades fisiológicas da barreira hemato-encefálica parecem encontrar-se alteradas. Nesta condição há um influxo de amônia para o SNC, uma vez que esta substância atravessa os capilares desta barreira por difusão. Segundo alguns pesquisadores do assunto, animais com hiperamonemia, tanto aguda como crônica, apresentaram um aumento na permeabilidade da barreira hemato-encefálica para compostos de alto peso molecular (Mirsan et al., 1975; Mirsan et al., 1977; Mirsan et al., 1985 ; Mirsan et al., 1983).




Muitos estudos observaram alterações nos sistemas de transporte da barreira hemato-encefálica em condições de hiperamonemia, principalmente para os aminoácidos. Segundo James et al. (James et al., 1978; James et al., 1979) os animais hiperamonêmicos apresentaram um aumento na captação de aminoácidos neutros pela barreira e, segundo Mans et al. (Mans et al., 1982), um aumento de fenilalanina, triptofânio e leucina. Já James et al., em 1983, demonstraram uma diminuição na captação de lisina. A partir destes resultados, estes autores sugeriram que amônia induz alterações nas características cinéticas dos carreadores presentes nesta barreira.

1.2.3.8 Efeitos da amônia sobre os vasos sanguíneos e sobre o fluxo sanguíneo

Os efeitos induzidos pela amônia sobre os vasos, e o fluxo sanguíneo, são ainda um tanto obscuros. Os resultados encontrados pelos pesquisadores do assunto são um tanto conflitantes. Alguns estudos demonstraram que a amônia provocou um efeito vasodilatador direto sobre os vasos sanguíneos cerebrais, uma vez que em macacos acordados, a infusão de amônia resultou num aumento do fluxo sanguíneo cerebral, sem alteração na pressão do sistema de perfusão, mas com uma moderada elevação da pressão intracraniana (Edt et al., 1977; Morhies et al., 1983). Resultados um pouco diferentes foram encontrados em experimentos com outras espécies. Em ratos, a hiperamonemia aguda diminuiu o fluxo sanguíneo global do cérebro, enquanto que em cães, uma diminuição mais substancial foi verificada (Fines et al., 1974). Já Zilay et al. (1985) encontrou alterações significantes no fluxo somente em algumas áreas cerebrais, como a ponte e mesencéfalo. No entanto, em ratos com hiperamonemia crônica, foi verificado um aumento no fluxo sanguíneo cerebral (Edde et al., 1978). Já em humanos, a hiperamonemia aguda também aumentou o fluxo sanguíneo cerebral (Cooper & Plum, 1987). Sner & Plum (1960) estudando um grupo que apresentava cirrose hepática crônica, encontraram um fluxo sanguíneo cerebral normal nos pacientes que não apresentavam encefalopatia. Contudo, quando estes pacientes desenvolviam sintomas neurológicos se observava uma diminuição no fluxo sanguíneo cerebral.

Pode-se dizer, portanto, que existem indícios de que as síndromes hipermonêmicas exercem efeitos diferentes sobre a circulação cerebral em todos os animais. No modelos agudos, as alterações podem variar conforme a espécie estudada e o modelo experimental utilizado (quantidade e duração da exposição a amônia, efeitos secundários de pH, etc). Já, modelos experimentais de hiperamonemia crônica parecem estar associados com um aumento no fluxo sanguíneo. No entanto, em humanos, ainda existem poucos dados satisfatórios relacionando hiperamonemia com alteração no fluxo sanguíneo cerebral.

1.2.3.9 Efeitos da amônia sobre as propriedades eletrofisiológicas das células do SNC

As concentrações elevadas de amônia parecem promover alterações nas propriedades eletrofisiológicas das células neuronais, interferindo no funcionamento da membrana celular e na transmissão sináptica. Alguns estudos demonstraram que a amônia alterou a atividade das ATPases da membrana celular. ou, em 1960, demonstrou que os íons amônios (NH_4^+) podiam substituir os íons potássio (K^+) na estimulação da ATPase da membrana de células nervosas de carangueijos. Além disso, lasivudu et alli (1977) verificaram que a toxicidade aguda da amônia em camundongos também levou a um aumento na atividade da Na^+ , K^+ -ATPase nos cérebros destes animais. No entanto, henker et al. (1967) não

encontraram aumento desta ATPase em ratos injetados com acetato de amônio, mas também perceberam que os íons NH_4^+ podiam substituir os íons K^+ na reação catalizada pela enzima.

Os íons NH_4^+ podem afetar o potencial de membrana e a excitabilidade dos neurônios porque se comportam como íons Na^+ e K^+ (Cooper & Plum, 1987). Os íons amônio atravessam a membrana neuronal com aproximadamente 30% da permeabilidade dos íons Na^+ - K^+ . Quando em altas concentrações, os íons amônio se comportam como íons K^+ e causam despolarização neuronal maciça, enquanto concentrações extracelulares menores de NH_4^+ (4-8 mM) diminuem o potencial de ação de pré-sinapses aferentes (Alger & Nicoll, 1983) e a amplitude dos potenciais sinápticos hiperpolarizantes dependentes de íons K^+ , tais como potencial hiperpolarizante tardio em preparações de células piramidais de hipocampo *in vitro* (Alger & Nicoll, 1983).

Em 1988, Allert et al. demonstraram que a amônia induziu despolarização em cultura de astrócitos de córtex de ratos por promover alterações nas concentrações intracelulares de íons. Segundo estes autores, a exposição destas culturas a concentrações elevadas de amônia induziu alterações morfológicas e bioquímicas similares àquelas encontradas na hiperamonemia *in vivo*. Estes autores verificaram que a amônia induziu uma lenta e reversível despolarização dose-dependente nestas células pela diminuição na condutância ao potássio. Além disso, o íon amônio entra para o meio intracelular por canais de potássio sensíveis ao bário.

1.2.3.10 Efeitos da amônia sobre o pH celular

Acredita-se que um dos maiores efeitos tóxicos causados pela amônia seja decorrente do aumento no pH celular induzido por este composto (Lehninger, 1995; Cooper & Plum, 1987). Em Kanamori & Ross demonstraram que a infusão de acetato de amônio em ratos causou uma elevação de pH nas células gliais de pH 7,1 para 7,4-7,5; particularmente em astrócitos, onde a glutamina é sintetizada e estocada. Embora o mecanismo pelo qual a amônia cause alcalinização nos astrócitos ainda não seja completamente entendido, estes autores sugeriram dois mecanismos para esta alteração: primeiro, a alcalinização pode ocorrer como um resultado direto do influxo de amônia e, segundo, pode ocorrer através da elevação da concentração de potássio intersticial induzida pela amônia, que causa despolarização da membrana glial, resultando em alcalinização intraglial mediada por um cotransportador de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (Kanamori & Ross, 1997). A forma não protonada NH_3 , que em pH 7,1 constitui aproximadamente 0,6% da amônia total ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$), por ser lipossolúvel facilmente se difunde através das membranas plasmáticas. A subsequente associação da NH_3 com o H^+ intracelular para formar íon amônio (NH_4^+), resulta em uma subtração de uma quantidade equivalente de H^+ da água celular e assim aumenta o pH intracelular (Cooper & Plum, 1987; Kanamori & Ross, 1997).

Além disso, quando o NH_4^+ é metabolizado à glutamina nas células gliais, pela glutamina sintetase, ocorre a liberação de prótons, porque o substrato participante desta reação deve ser o íon NH_3 ,


conforme a reação abaixo (Kanamori & Ross  1997).



Figura 8 – Reação da glutamina sintetase. A glutamina sintetase catalisa a conversão da amônia tecidual em glutamina promovendo a liberação de prótons no meio celular e íons OH⁻.

Na reação acima o composto RCOO⁻ representa a estrutura da glutamina e n a estequiometria do próton liberado pela hidrólise de ATP. Portanto, a hidroxila (OH⁻) liberada pela amidação é neutralizada principalmente pelo próton liberado pela hidrólise do ATP. Conseqüentemente, enquanto o influxo de amônia acumulado como NH₄⁺ causa alcalinização intracelular, a amônia que é metabolizada à glutamina não causa alteração no pH intracelular, pois a OH⁻ liberada é tamponada pelos prótons da mesma reação. Estas considerações sugerem que o efeito alcalinizante da amônia, provavelmente torne-se mais importante à medida que ocorre saturação da glutamina sintetase com a amônia e que, a amônia oriunda do sangue comece a se acumular nos astrócitos como íons NH₄⁺ (Kanamori & Ross, 1997).

Além destes mecanismos, tem sido sugerido que a hipermamonemia pode induzir alcalinização por decréscimo na capacidade tamponante intracelular, devido à diminuição na pressão de CO₂ (PCO₂) cerebral (Kanamori & Ross, 1997). Dois fatores podem contribuir para a diminuição da PCO₂ cerebral: primeiro, em

condições normais, quando ocorre hipocapnia há diminuição no fluxo sanguíneo cerebral para reduzir a perda de CO₂. No entanto, esta resposta regulatória é alterada pela hiperamonemia. Segundo, a hiperamonemia também estimula a fixação anaplerótica de CO₂, catalizada pela enzima glial piruvato carboxilase, resultando em adicional decréscimo da concentração de CO₂. Em decorrência da diminuição da PCO₂ nos astrócitos, pode ocorrer um importante decréscimo na capacidade tamponante celular, resultando assim numa importante alteração no pH celular que pode contribuir para os efeitos tóxicos provocados pela amônia (Kanamori & Ross, 1997).

1.3. *Sucinato Desidrogenase*

A succinato desidrogenase (EC 1.3.99.1) é uma enzima de central importância no metabolismo aeróbico celular. Está presente nas mitocôndrias celulares onde faz parte do complexo II da cadeia respiratória, catalisando a oxidação do succinato até fumarato no ciclo de Krebs e transferindo equivalentes redutores diretamente para a cadeia respiratória (Lehninger, 1995). A maior parte das moléculas de enzima encontra-se ancorada na membrana interna desta organela, porém uma pequena fração de enzima se encontra na forma solúvel (Ackrell et al., 1974).

A SDH está presente em vários organismos, e sua estrutura primária é bem conservada (Hederstedt & Hedén, 1989), sendo classificada como uma flavoenzima ferro-enxofre. Sua estrutura é composta por quatro subunidades: um domínio hidrofílico, que compreende uma flavoproteína (Fp) com uma porção histidil-FAD, e uma subunidade ferro-enxofre (Ip), que abriga os três grupos $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+,1+}$, $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+,1+}$ e $[3\text{Fe}-4\text{S}]^{1+,0}$. Dois polipeptídeos $\text{C}_{\text{II-3}}$ e $\text{C}_{\text{II-4}}$ agem como âncoras à membrana para a subunidade catalítica e provém os sítios ligantes para a ubiquinona. Todas as quatro subunidades são codificadas no núcleo e devem ser importadas para a mitocôndria (Egger et al., 1995).

Em 1989, um estudo realizado com marcação radioativa em SDH isolada de coração de boi demonstrou que o sítio catalítico se localiza na subunidade Fp (Ederstedt & Hedén, 1989). Este sítio aparentemente possui um resíduo essencial de cisteína, uma vez que o

substrato e análogos ao substrato, como o malonato, conferem proteção à inativação por reagentes que modificam grupos tióis como bromopiruvato e N-etilmaleimida (Honey, 1975; Hederstedt & Hedén, 1989). Estes achados sugerem que o resíduo essencial de cisteína está localizado no sítio catalítico ou muito próximo a ele. O resíduo de cisteína parece não ser essencial à oxidação do substrato, porém essencial à ligação do substrato ao sítio catalítico (Hederstedt & Hedén, 1989). Contudo, em Lê-Quôc et al. demonstraram a presença de outro grupo essencial sulfidrila para a atividade da SDH além do já conhecido. Neste estudo foram utilizados três derivados maleimidados com diferentes hidrofobicidades, que revelaram a presença de duas classes de grupos sulfidrilas essenciais para a atividade da SDH, porém com diferentes reatividades. Os resultados indicaram que o grupo sulfidrila mais reativo estava localizado no sítio catalítico, pois o substrato e inibidores competitivos, como malonato, protegeram o grupo contra a inibição causada pelos reagentes, confirmando os dados já existentes. No entanto, os ligantes do sítio catalítico não previniram completamente a inativação da SDH e análise da cinética da inibição na presença de substrato indicaram que o grupo sulfidrila com baixa reatividade não pertencia ao sítio catalítico. Foi demonstrado que a maioria dos grupos tióis mais reativos estavam localizados num microambiente hidrofóbico uma vez que estes grupos foram sensíveis ao caráter hidrofóbico do reagente. A reatividade da outra classe de grupos tióis não foi influenciada pela natureza do reagente. Quando a enzima estava pouco ativa, ou seja, ligada ao oxalacetato, nenhum dos dois grupos reagiram com os

compostos alquilantes, indicando a possibilidade de que estes grupos possam ser mascarados pela mudança conformacional que a ligação com o oxalacetato induz na enzima (Lê-Quôc et al., 1981).

Além do resíduo de cisteína, o sítio catalítico parece conter também um resíduo histidil. A atividade da enzima é inibida por dietilpirocarbonato, um composto que reage com grupos imidazol dos resíduos histidil, e é protegida pelo substrato e análogos como malonato e oxalacetato, e ativadores como NaClO₄ e NaBr (Eck & Hatefi, 1981). Estes resultados sugerem a presença de um resíduo essencial histidil provavelmente localizado no sítio catalítico.

A SDH se encontra sob duas formas: uma ativa e uma pouco ativa. As moléculas de enzima sofrem transição de uma forma para a outra, conforme as condições do meio, tais como pH, temperatura, potencial redox e presença de íons e moléculas ativadoras (Earney et al., 1974). Na forma ativa, a enzima normalmente se encontra livre, ou seja, não ligada a nenhum composto. Já na forma pouco ativa, a enzima se encontra fortemente ligada, em uma proporção de 1:1 (Ackrell et al., 1974), ao oxalacetato, um composto que está presente na maioria das preparações da enzima.

Além da ligação ao oxalacetato, outro fator que determina a atividade da enzima é o seu estado conformacional. A enzima pode apresentar mudanças na sua conformação que determina alterações no seu padrão de atividade, resultando assim em conformações ativas ou pouco ativas (Ackrell et al., 1974).

1.3.1 Inibidores da atividade da SDH

A succinato desidrogenase é inibida competitiva e reversivelmente por oxalacetato (Ackrell et al., 1974), malonato (Ebene et al., 1993; Ebene & Greenamyre, 1995;) e metilmalonato (Etra et al., 1993), e irreversivelmente por ácido 3-nitropropiónico (Essel & Sonnewald, 1995; Ebuillet et al., 1998) uma vez que são compostos análogos ao substrato da enzima. Também é inibida pelos reagentes de grupos tióis bromopiruvato e N-etilmaleimida (Kenney, 1975), pelo reagente de grupo imidazol dietilpirocarbonato (E & Hatefi, 1981) que reagem com os resíduos presentes no sítio catalítico, por malato que oxida a enzima (Egutman & Silman, 1975), por íons sulfato que parecem interagir com o sítio catalítico (Ettlyar & Vinogradov, 1983).

1.3.2 Ativadores da atividade da SDH

A ativação da enzima pode ocorrer devido a uma mudança conformacional, deslocamento do oxalacetato (Ackrell et al., 1974) ou mudança no estado redox (Gutman & Silman, 1975). Conforme Kearney et al. (1974), a ativação por ânions em valores de pH neutro ou levemente alcalinos é decorrente de uma mudança conformacional na estrutura proteica, uma vez que este tipo de ativação possui uma alta energia de ativação, embora o valor não seja tão alto como para ativação pelo substrato e pela coenzima Q reduzida.

A enzima é ativada pelo substrato, por coenzima Q reduzida,

pelos íons cloretos (Cl^-), brometos (Br), percloratos (ClO_4^-) (Kearney et al., 1974; Vik & Hatefi, 1981), fosfatos (Kenney, 1975), acetatos (Ebinson & Weiner, 1981), pelo ATP, IDP e ITP (Gutman & Silman, 1975), pelos íons cálcio (Ca^{+2}) (Ehawa & Ogata, 1979) e zinco (Zn^{+2}) (Eimaguchi et al., 1982).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve os seguintes objetivos:

1. Investigar o efeito da amônia sobre as alterações comportamentais induzidas pela injeção de MMA intra-estriatal em ratos.
2. Investigar o efeito da amônia sobre a atividade da SDH *in vitro*.
3. Determinar se a amônia potencializa o efeito inibidor do MMA sobre a SDH *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes

2,6-Diclorofenolindofenol – Sigma

Acetato de amônio - Merck

Ácido clorídrico - Vetec

Ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) – sal de potássio –
Reagen

Ácido fosfórico – Synth

Ácido metilmalônico – Sigma

Ácido succínico – Sigma

Albumina - Sigma

Cianeto de potássio - Merck

Cloreto de amônio - Nuclear

Cloreto de Magnésio - Reagen

Cloreto de potássio – Merck

Cloreto de sódio – Ecibra

Comassie brilhante blue - Sigma

Etanol – Chemco

Fenasina metassulfato – Sigma

Fosfato de potássio dibásico - Synth

Fosfato de potássio monobásico - Synth

Glicose - Merck

Hidróxido de potássio – Merck

Hidróxido de sódio – Merck

Rotenona – Sigma

Sacarose – Vetec

3.2. Soluções

3.2.1 Comassie Blue

- 50 mg de Comassie brilhante blue

- 25 ml de etanol p.a 95%

- 50 ml de ácido fosfórico 85%

- água ultrapura tipo II q.s.p. 500 ml

O comassie blue foi dissolvido em etanol e acrescentada parte da água ultrapura tipo II. Foi então acrescentado o ácido fosfórico e completado até o volume desejado com o restante da água. A solução foi filtrada antes do seu uso.

3.2.2 Tampão de homogeneização:

- sacarose 0,32 M
- ácido etilenodiamino tetracético 0,5 mM
- Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 em água ultrapura tipo II.

3.2.3 Solução de ácido metilmalônico pH 7,4

O ácido foi pesado, dissolvido em água ultrapura tipo II e elevado o pH até 7,4 com KOH.

3.2.4 Solução de ácido succínico 333 mM pH 7,0

O ácido succínico foi dissolvido em água ultrapura tipo II e o pH ajustado com solução de fosfato de potássio dibásico.

3.2.5 Solução de albumina

A albumina foi dissolvida em água ultrapura tipo II até uma concentração final de 1 mg/ml.

3.2.6 Solução de cianeto de potássio 122,5 mM

O cianeto de potássio foi dissolvido em água ultrapura tipo II.

3.2.7 Solução de cloreto de amônio

O cloreto de amônio foi dissolvido em água ultrapura tipo II.

3.2.8 Solução de cloreto de potássio

O cloreto de potássio foi dissolvido em água ultrapura tipo II.

3.2.9 Solução de diclorofenolindofenol (DCIP) 1,7 mM

O DCIP foi dissolvido em água ultrapura tipo II.

3.2.10 Solução de fenasina metassulfato 7,5 mM

A fenasina metassulfato foi dissolvida em água ultrapura tipo II.

3.2.11 Solução de rotenona 30 µg/ml

A rotenona foi dissolvida em etanol na proporção de aproximadamente 10% do volume final da solução. O volume foi completado com água ultrapura tipo II.

3.2.12 Solução salina-sacarose, pH 7,2

- sacarose 270 mM
- cloreto de magnésio 5 mM

- glicose 20 mM
- cloreto de sódio 0,9 %

Dissolvidos em tampão fosfato de potássio 270 mM pH 7,2

3.2.13 Tampão fosfato 150 mM pH 7,5

Foram dissolvidos em água ultrapura tipo II e em frascos separados fosfato de potássio dibásico e fosfato de potássio monobásico na concentração indicada. A solução de fosfato de potássio monobásico foi adicionada à solução de fosfato de potássio dibásico até atingir o pH 7,5.

3.3. Equipamentos

- Agitador de tubos – marca Phoenix AP56
- Agitador magnético – marca IKR- Combimag-RCT
- Balança analítica - marca Gibertini
- Balança semianalítica – marca Acculab V400
- Banho-maria – marca Biomatic
- Centrífuga refrigerada – marca Hitachi
- Crônometros – marca Casio
- Espectrofotômetro – marca Carl Zeiss M4 QIII
- Espectrofotômetro – marca Hitachi U-2001

- Estereotáxico – marca Medicor Hungria
- Freezer a - 20 °C – marca Cònsul
- Geladeira a 4 °C – marca Cònsul
- Homogeneizador – marca Potter-Elvenjheim
- Medidor de pH (pHmetro) – marca Quimis
- Purificador de água- marca EASYPURE RF Barnstead – Compact ultrapure water system

3.4. Amostra

Foram utilizados ratos Wistar de ambos os sexos alimentados com ração adequada, fornecida por Guabi, e água “ad libitum” e mantidos em ambiente climatizado em temperatura de 22 °C com 12 horas de intervalo de luminosidade claro/escuro. Ratos pesando entre 280 e 300 g foram utilizados para os experimentos.

3.4.1 Avaliação comportamental

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com tiopental na dose de 250 mg/kg e fixados num aparelho esterotáxico. Uma cânula foi inserida unilateralmente no estriado (coordenadas relativas ao bregma: AP 0 mm, ML 3,2 mm, V 3,0 mm da dura). Imediatamente antes da implantação da cânula, foi administrado intraperitonealmente cloranfenicol na dose de 200 mg/kg. Três dias após o procedimento cirúrgico, os animais foram injetados

subcutaneamente com acetato de amônio na dose de 1,5 mmol/kg ou acetato de sódio na mesma dose e, após 5 minutos, com 3 μ mol de MMA (pH 7,4 tamponado com NaOH) ou 4,5 μ mol de NaCl através da cânula no estriado. O volume de MMA injetado foi de 1 μ l durante 1 minuto. Imediatamente após a injeção, os animais foram transferidos para um campo aberto circular cujo assoalho era dividido em 11 áreas e observados por 20 minutos para o aparecimento de episódios convulsivos e respostas rotacionais. Uma rotação foi considerada como um movimento compreendendo não mais que três áreas. O número de episódios convulsivos e de rotações ipsilaterais e contralaterais ao hemisfério cerebral injetado, assim como a duração dos episódios convulsivos foram avaliados.

A dose subconvulsivante de acetato de amônio a ser usada foi determinada em experimento piloto, pela injeção subcutânea de 0,5, 1,5 ou 5 mmol/kg de acetato de amônio e, como controle, de 5 mmol/kg de acetato de sódio, ambos 1 ml/kg, nos animais não implatados com cânula.

3.4.2 Avaliação bioquímica

A atividade da enzima SDH foi avaliada em frações enriquecidas em mitocôndrias do estriado de cérebro de ratos.

3.4.2.1 Preparação da fração enriquecida em mitocôndrias

Os animais foram mortos por decaptação sem a utilização de

anestésicos e o cérebro rapidamente dissecado em uma placa de Petri invertida sobre gelo. O estriado foi cuidadosamente retirado e o restante do cérebro foi descartado. O estriado foi homogeneizado em 10 volumes (g/v) de tampão de homogeneização. Em centrífuga refrigerada, à temperatura de 4 °C, o homogeneizado foi centrifugado a 3 000 rpm (1 000 x g) por 10 minutos e o sobrenadante obtido foi centrifugado a 10 000 rpm (12 000 x g) por 20 minutos. O precipitado resultante foi ressuscitado em solução salina-sacarose com pH 7,2 na proporção de 60% do seu volume e congelado por 24 horas. O conteúdo de proteína foi determinado por Bradford (1977) e ajustado para 1 mg/ml com solução salina-sacarose.

3.4.2.2 Padronização do método utilizado para determinação da atividade da SDH

As concentrações ideais de proteína, fenasina metassulfato e DCIP para medida da atividade succinato desidrogenásica foram determinadas.

3.4.2.3 Determinação da atividade da succinato desidrogenase in vitro

A atividade da succinato desidrogenase foi avaliada segundo Dutra (1993) utilizando 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP) como acceptor de elétrons na presença de fenasina metassulfato. A mistura

reacional (1500 µl) contendo 50 mM de tampão fosfato com pH 7,5, 1,5 mM de cianeto de potássio, 30,6 µM 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP), 3 µg de rotenona, 5 mM de succinato de sódio, 0,5 mM de fenasina metassulfato, 0-100 mM de ácido metilmalônico, 0-10 mM de cloreto de amônio ou 0-10 mM de cloreto de potássio. A mistura foi pré-incubada por 1 minuto a 37 °C, e a reação foi iniciada pela adição da fração mitocondrial (50 µg de proteína). A redução do DCIP foi medida espectrofotometricamente pela monitoração da queda da absorbância a 600 nm por 30 segundos.

3.5. Análise estatística

Os dados comportamentais foram analisados por análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA), dependendo do desenho experimental utilizado.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação comportamental

4.1.1 Efeito da amônia sobre o número e duração dos episódios convulsivos induzidos pelo MMA

A análise estatística (ANOVA de duas vias) revelou que a pré-administração de acetato de amônio potencializou o efeito convulsivante do MMA: Interação 2 (acetato de amônio ou acetato de sódio) X 2 (NaCl ou MMA) significativa: $F(1,40)= 4,20$; $p<0,05$.

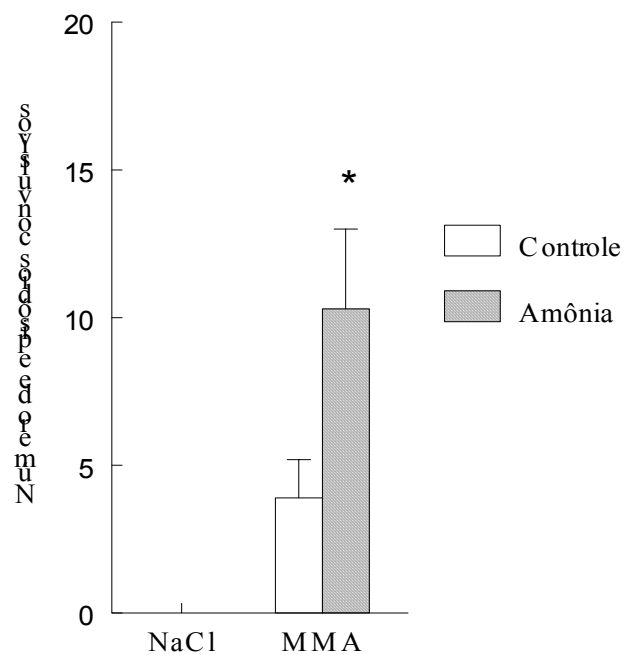


Figura 9 - Efeito do acetato de amônio (1,5 mmol/Kg; s.c.) sobre o número dos episódios convulsivos induzidos pelo MMA (3 μ mol). Os animais injetados com NaCl não apresentaram convulsões. Dados apresentados são média + EP para n=11 por grupo. Os resultados da ANOVA de duas vias são apresentados no texto.

A pré-administração de acetato de amônio, além de aumentar o

número de convulsões, provocou um aumento na duração dos episódios convulsivos induzidos por MMA: Interação 2 (acetato de amônio ou acetato de sódio) X 2 (NaCl ou MMA) significante: $F(1,40)=5,2; p<0,05$.

Figura 10 - Efeito do acetato de amônio (1,5 mmol/Kg; s.c.) sobre a duração dos episódios convulsivos induzidos pelo MMA (3 μ mol). Os animais injetados com NaCl não apresentaram convulsões. Dados apresentados são média + EP para n=11 por grupo. Os resultados da ANOVA de duas vias são apresentados no texto.

4.1.2 Efeito da amônia sobre o número de rotações contralaterais

A análise estatística do número de rotações contralaterais em direção ao hemisfério injetado revelou somente que o MMA induz ao aparecimento rotações contralaterais. Efeito do MMA ou NaCl significantes: $F(1,40)=17,36$; $p<0,001$.

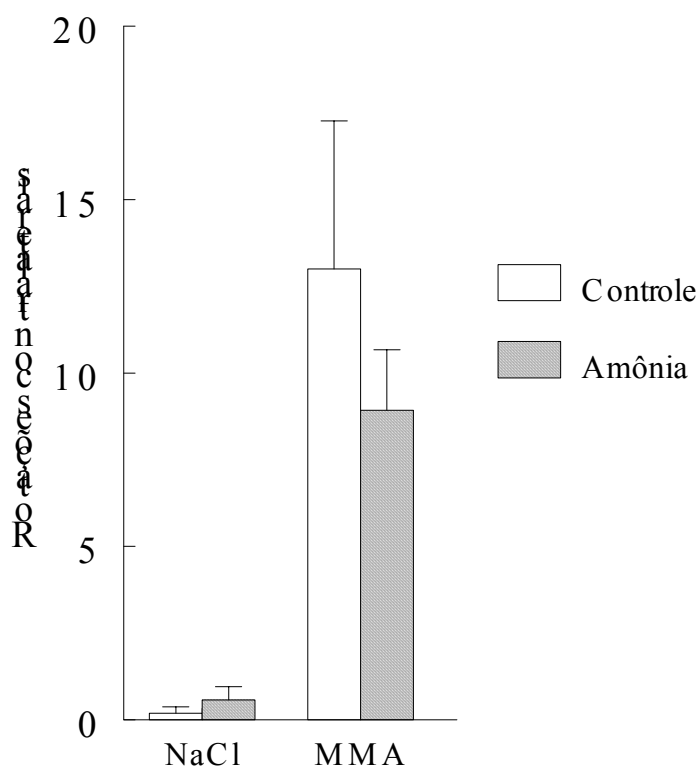


Figura 11 - Efeito o acetato de amônio (1,5 mmol/Kg; s.c.) sobre o número de rotações contralaterais induzidas pelo MMA (3 μ mol). Dados apresentados são média + EP para n=11 por grupo. Os resultados da ANOVA de duas vias são apresentados no texto.

4.2. Avaliação bioquímica

4.2.1 Padronização do método utilizado para determinação da atividade da SDH

4.2.1.1 Determinação da quantidade de proteína

Os resultados obtidos indicaram que a atividade enzimática era linear com a concentração de proteína em uma faixa de 25 a 200 μg de proteína/1500 μl , e que a concentração de 50 μg /1500 μl , utilizada para os experimentos de determinação da atividade da SDH, encontrava-se dentro de uma faixa linear de reação.

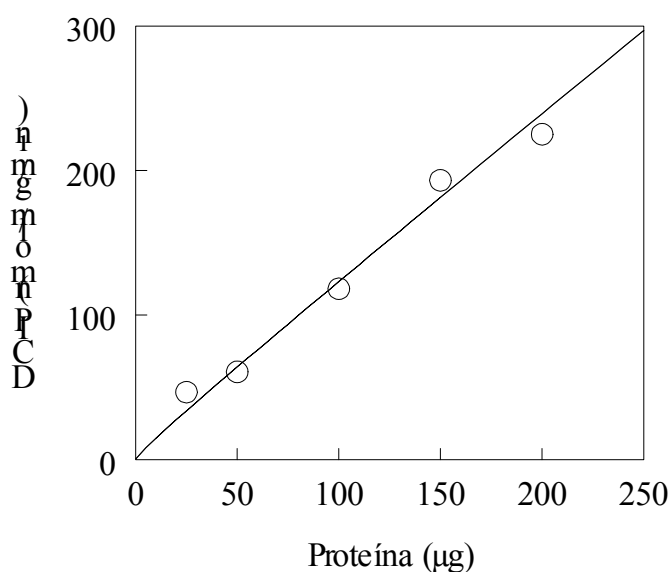


Figura 12 - Efeito da quantidade de proteína no meio reacional sobre a velocidade de redução do DCIP. Os dados apresentados são de um experimento representativo de um total de três, que tiveram comportamento semelhante. A redução do DCIP foi medida espectrofotometricamente pela queda da absorbância em 600 nm por 30 segundos

4.2.1.2 Determinação da concentração de DCIP

A concentração de DCIP utilizada, 30,6 μM permitiu a reação se mantivesse em uma faixa linear durante o experimento onde foi medida a atividade da SDH frente ao MMA e amônia.

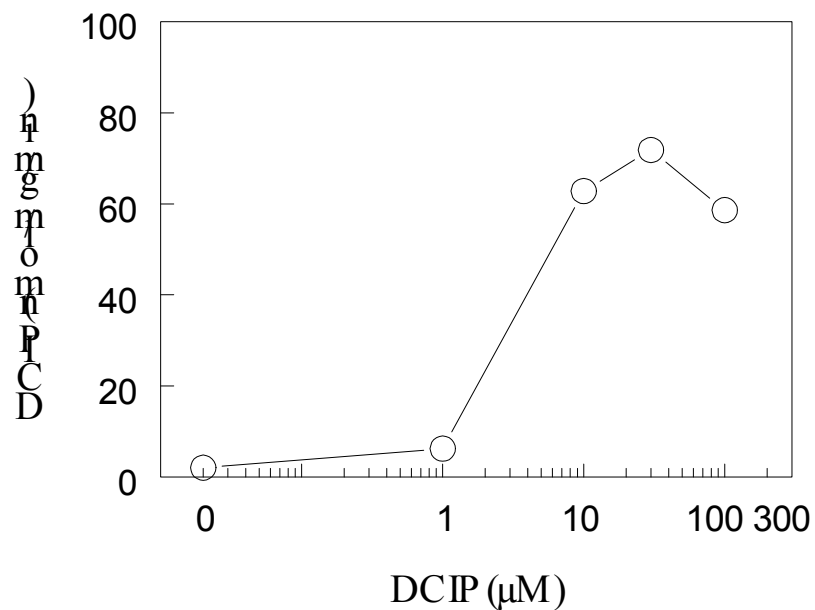


Figura 13 - Efeito da concentração de DCIP sobre a linearidade da reação na determinação da atividade da SDH. Os dados apresentados são de um experimento representativo de um total de três, que tiveram comportamento semelhante. A redução do DCIP foi medida espectrofotometricamente pela queda da absorbância em 600 nm por 30 segundos

4.2.1.3 Determinação da concentração de fenasina

Os resultados obtidos indicaram que a concentração de 0,5 mM de fenasina propiciou um nível adequado de atividade enzimática para a SDH e o aparecimento da inibição da enzima por MMA, sugerindo que a inibição da SDH por MMA depende do meio de incubação.

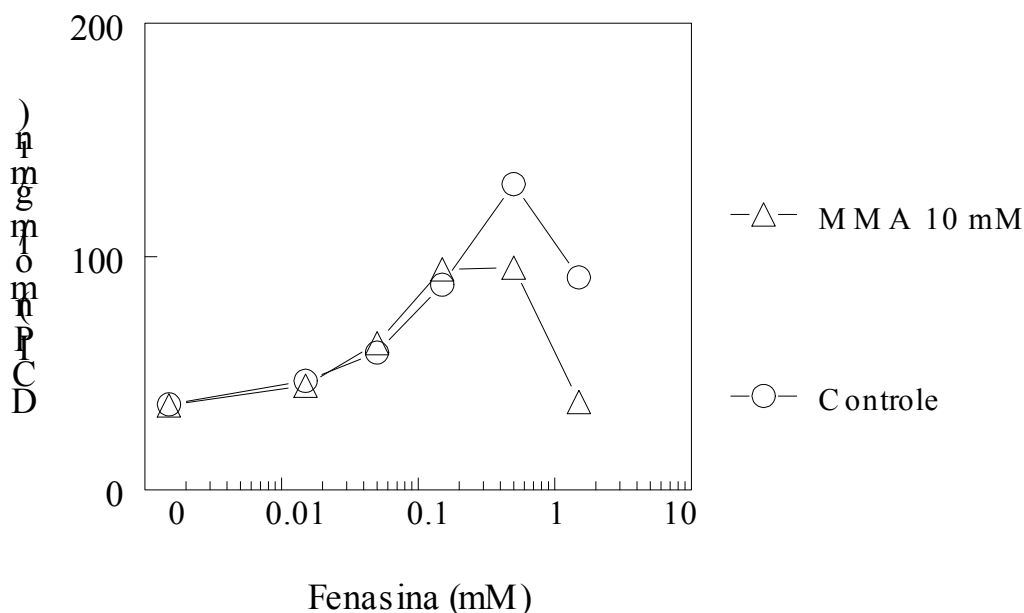


Figura 14 - Efeito da concentração de fenasina metassulfato sobre a atividade da SDH e sua inibição induzida pelo MMA. As frações enriquecidas em mitocôndrias (50 μ g de proteína) foram incubadas a 37 °C por 1 minuto em meio contendo 50 mM de tampão fosfato com pH 7,5; 1,5 mM de cianeto de potássio, 30,6 μ M 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP), 3 μ g de rotenona, 5 mM de succinato de sódio, 0-1,5 mM de fenasina metassulfato e 10 mM de ácido metilmalônico. A redução do DCIP foi medida espectrofotometricamente pela queda da absorbância em 600 nm por 30 segundos.

4.2.2 Determinação da atividade da succinato desidrogenase *in vitro*

4.2.2.1 Efeito do MMA sobre a atividade da SDH

Os resultados obtidos confirmaram os dados da literatura de que o MMA inibe a enzima SDH de maneira dose-dependente.

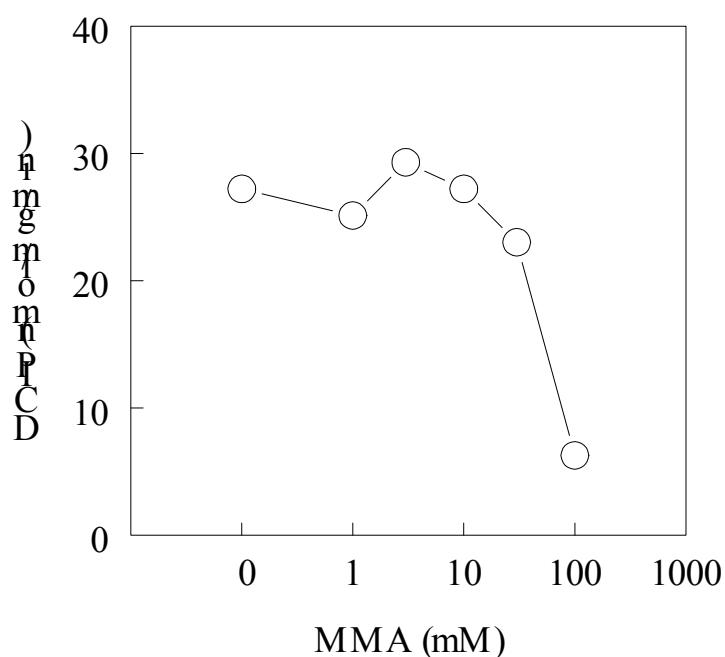


Figura 15 - Efeito do MMA sobre a atividade da SDH. As frações enriquecidas em mitocôndrias (50 μg de proteína) foram incubadas a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto em meio contendo 50 mM de tampão fosfato com pH 7,5; 1,5 mM de cianeto de potássio, 30,6 μM 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP), 3 μg de rotenona, 5 mM de succinato de sódio, 0,5 mM de fenasina metassulfato e 0-100 mM de ácido metilmalônico. A redução do DCIP foi medida espectrofotometricamente pela queda da absorbância em 600 nm por 30 segundos.

4.2.2.2 Efeito do KCl e NH₄Cl sobre a atividade da SDH

Os resultados demonstraram que tanto o cloreto de potássio como o cloreto de amônio não têm efeito sobre a atividade da enzima SDH.

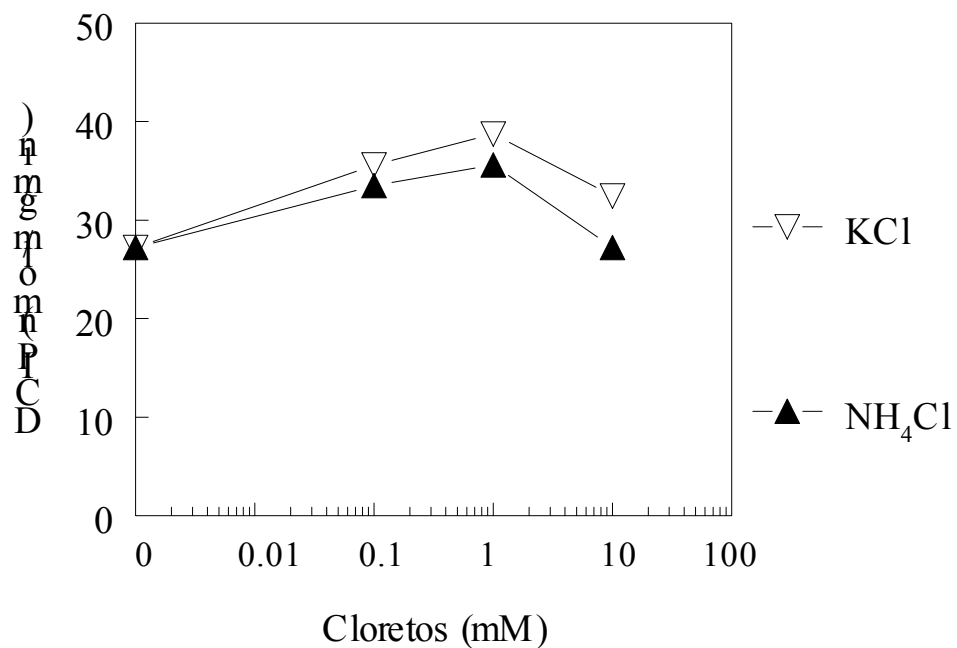


Figura 16 - Efeito do KCl e NH₄Cl sobre a atividade da SDH. As frações enriquecidas em mitocôndrias (50 μg de proteína) foram incubadas a 37 °C por 1 minuto em meio contendo 50 mM de tampão fosfato com pH 7,5; 1,5 mM de cianeto de potássio, 30,6 μM 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP), 3 μg de rotenona, 5 mM de succinato de sódio, 0,5 mM de fenasina metassulfato, 0-10 mM de cloreto de amônio ou 0-10 mM de cloreto de potássio. A redução do DCIP foi medida espectrofotometricamente pela queda da absorbância em 600 nm por 30 segundos.

4.2.2.3 Efeito da amônia sobre o efeito inibidor do MMA sobre a SDH

Os resultados obtidos indicaram que a amônia nas concentrações de 0,1, 1 e 10 mM (Figuras 17 a 19) não tem efeito sobre a inibição que o MMA apresenta sobre a enzima SDH. Os gráficos abaixo mostram as médias de triplicatas de um experimento representativo de três diferentes experimentos.

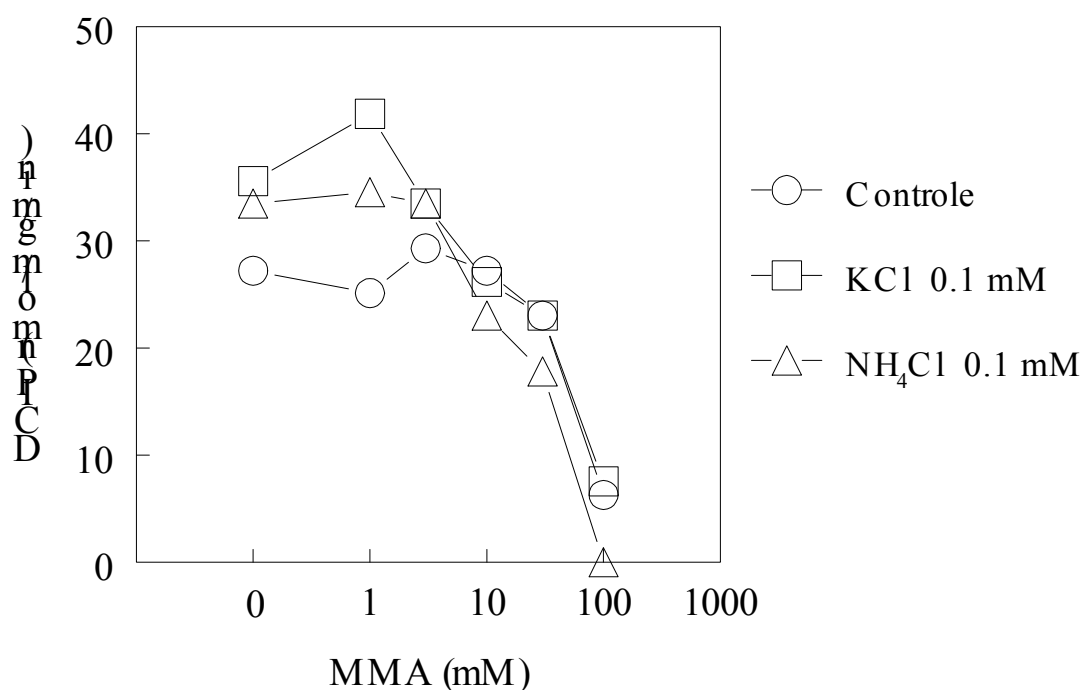


Figura 17 - Efeito de 0,1 mM de cloreto de amônio sobre o efeito inibidor do MMA sobre a atividade da SDH. As frações enriquecidas em mitocôndrias (50 µg de proteína) foram incubadas a 37 °C por 1 minuto em meio contendo 50 mM de tampão fosfato com pH 7,5; 1,5 mM de cianeto de potássio, 30,6 µM 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP), 3 µg de rotenona, 5 mM de succinato de sódio, 0,5 mM de fenasina metassulfato, 0-100 mM de ácido metilmalônico, 0-10 mM de cloreto de amônio ou 0-10 mM de cloreto de potássio. A redução do DCIP foi medida espectrofotometricamente pela queda da absorbância em 600 nm por 30 segundos

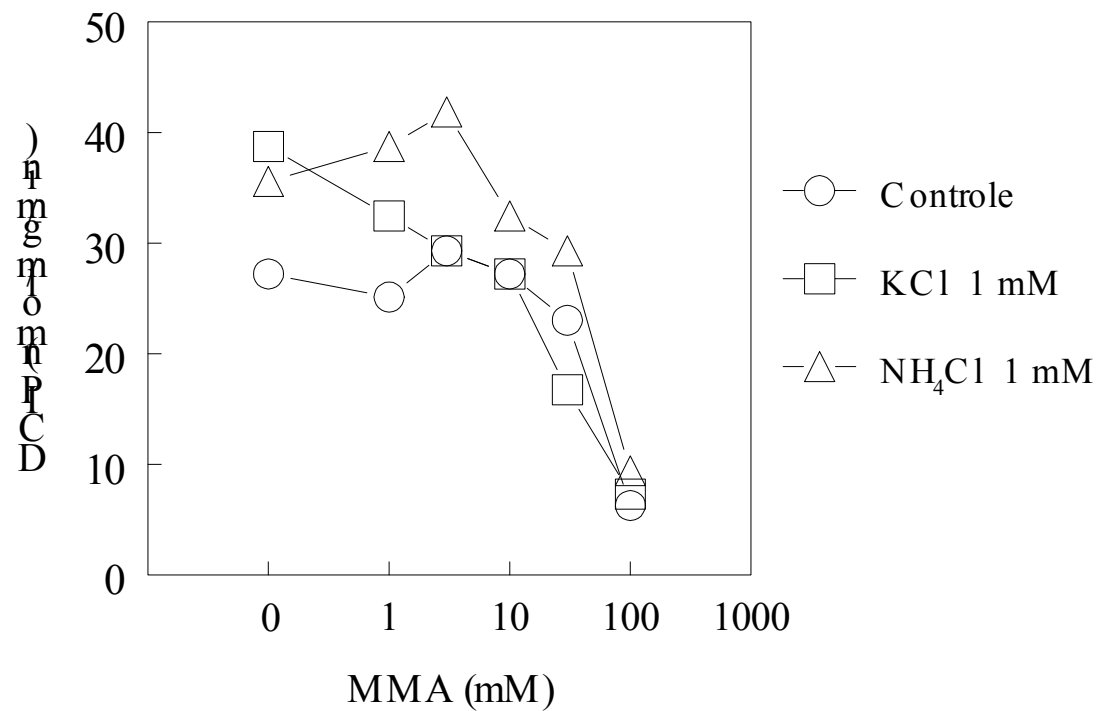


Figura 18 - Efeito de 1 mM de cloreto de amônio sobre o efeito inibidor do MMA sobre a atividade da SDH. As frações enriquecidas em mitocôndrias (50 μ g de proteína) foram incubadas a 37 °C por 1 minuto em meio contendo 50 mM de tampão fosfato com pH 7,5; 1,5 mM de cianeto de potássio, 30,6 μ M 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP), 3 μ g de rotenona, 5 mM de succinato de sódio, 0,5 mM de fenasina metassulfato, 0-100 mM de ácido metilmalônico, 0-10 mM de cloreto de amônio ou 0-10 mM de cloreto de potássio. A redução do DCIP foi medida espectrofotometricamente pela queda da absorbância em 600 nm por 30 segundos

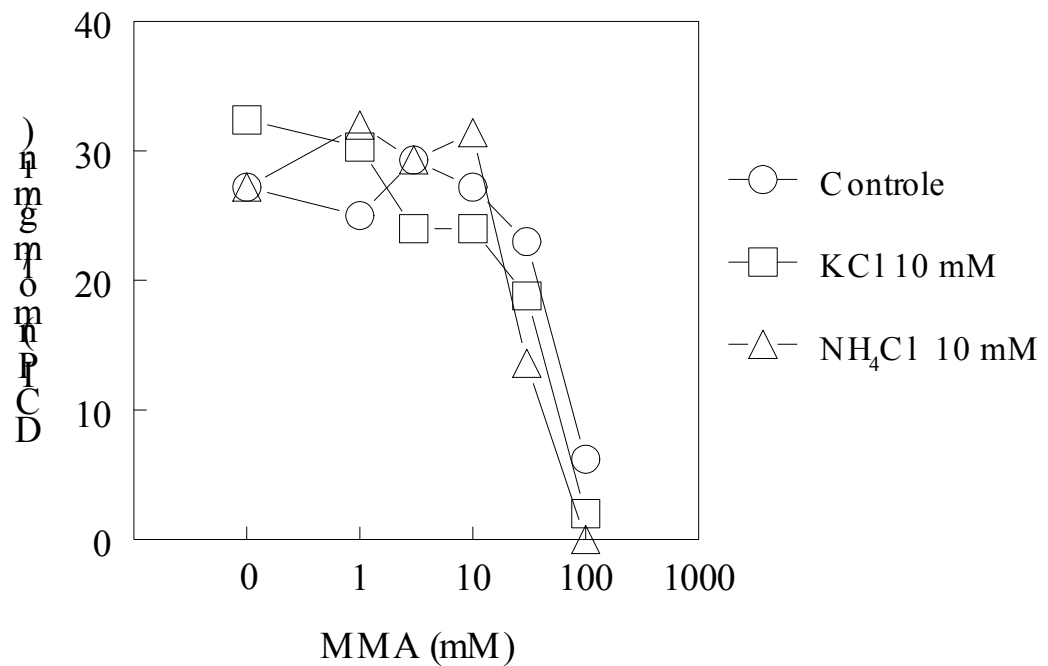


Figura 19 - Efeito de 10 mM cloreto de amônio sobre o efeito inibidor do MMA sobre a atividade da SDH. As frações enriquecidas em mitocôndrias (50 μ g de proteína) foram incubadas a 37 $^{\circ}$ C por 1 minuto em meio contendo 50 mM de tampão fosfato com pH 7,5; 1,5 mM de cianeto de potássio, 30,6 μ M 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP), 3 μ g de rotenona, 5 mM de succinato de sódio, 0,5 mM de fenasina metassulfato, 0-100 mM de ácido metilmalônico, 0-10 mM de cloreto de amônio ou 0-10 mM de cloreto de potássio. A redução do DCIP foi medida espectrofotometricamente pela queda da absorbância em 600 nm por 30 segundos

5. CONCLUSÕES

1 – A amônia potencializa o efeito convulsivante do ácido metilmalônico quando injetado em estriado de ratos.

2 – A inibição da succinato desidrogenase pelo ácido metilmalônico *in vitro* depende da concentração de fenasina.

3 – A amônia não tem efeito sobre a atividade da succinato desidrogenase *in vitro*.

4 – A amônia não modifica o efeito inibitório do ácido metilmalônico sobre a succinato desidrogenase *in vitro*.

5 – Os dados sugerem que os mecanismos pelos quais a amônia potencializa o efeito convulsivante do ácido metilmalônico não sejam diretamente ligados à inibição da atividade da enzima succinato desidrogenase

6. DISCUSSÃO

A acidemia metilmalônica é um erro inato do metabolismo bioquimicamente caracterizado por acúmulo tecidual de metilmalonil-CoA e propionil-CoA e seus respectivos ácidos livres, ácido metilmalônico e propiônico (Scriver, 1995). Essa doença é causada por deficiência ou falta de atividade da enzima metilmalonil-CoA mutase (EC 5.4.99.2), enzima envolvida na rota de degradação de aminoácidos de cadeia ramificada, ácidos graxos de cadeia ímpar, cadeia lateral do colesterol e algumas bases nitrogenadas e responsável pela conversão do propionil-CoA em metilmalonil-CoA.

A acidemia metilmalônica é caracterizada por cetoacidose neonatal e infantil, falência no desenvolvimento e disfunção neurológica, incluindo convulsões (Fenton & Rosenberg, 1995). A hiperamonemia é um dos principais achados na acidemia metilmalônica, e está presente em aproximadamente 70% dos pacientes (Scriver, 1995). Esta alteração bioquímica parece ser causada pela inibição que os ésteres de CoA acumulados provocam sobre a atividade da enzima N-acetilglutamato sintetase, desta forma diminuindo a conversão de amônia em uréia (Coude et al., 1979; Glasgow & Chase, 1976).

A hiperamonemia está envolvida na patogênese da encefalopatia hepática e outras condições patológicas em que ocorre acúmulo de amônia, como deficiências congênitas nas enzimas do ciclo da uréia e acidemias orgânicas (Ratnakumari et al., 1995; Stewart et al., 1980).

Estas condições hiperamonêmicas são acompanhadas por disfunção neurológica e convulsões. Embora os mecanismos básicos pelos quais a amônia induz neurotoxicidade ainda não estejam completamente esclarecidos, existem evidências de que tais mecanismos envolvam falência no metabolismo energético e depleção de ATP (Hindfeld et al., 1977; Felipo et al., 1994; Kosenko et al., 1994; 1995; Ratnakumari et al., 1995), ativação de receptores glutamatérgicos (Felipo et al., 1994; Zhou et al., 1999; Bosman et al.; 1992), geração de radicais livres (Kosenko et al., 1997; 1999), alterações nas funções de alguns neurotransmissores (Hindfeld et al., 1977; Cooper & plum, 1987; Butterworth et al., 1991; Felipo et al., 1994; Zhou et al., 1999) prejuízo aos mecanismo de neuroproteção endógenos (Hicks et al., 1994), alterações nas células do SNC (Drewe & Leino, 1985; Dolinska et al., 1996), alterações na barreira hemato-encefálica (Fisher et al., 1978; 1979; Cooper & Plum, 1987), alterações sobre o fluxo e vasos sanguíneos (Cooper & Plum, 1987), alterações nas propriedades eletrofisiológicas das células do SNC (Schenker et al., 1967; Cooper & Plum, 1987), alterações no pH celular (Lehninger, 1995; Kanamori & Ross, 1997).

Até o presente momento não havia sido investigada uma possível interação entre os efeitos tóxicos causados pelo MMA, o principal metabólito acumulado na acidemia metilmalônica, e os causados pela amônia, um metabólito secundário também acumulado nos pacientes portadores da doença.

Em 1993 foi demonstrado que o ácido metilmalônico inibe a atividade da enzima succinato desidrogenase e β -hidroxibutirato

desidrogenase de ratos *in vitro* (Dutra et al., 1993). Além disso, foi demonstrado que a administração intraestriatal aguda de MMA em ratos induz convulsões por mecanismos glutamatérgicos (Mello et al., 1996), provavelmente envolvendo inibição do ciclo de Krebs, depleção de ATP e geração de radicais livres (Mello et al., 1999). Estes resultados sugeriram que o acúmulo de MMA pode ter um papel crítico na gênese das convulsões observadas nos pacientes com acidemia metilmalônica.

Embora tenha sido sugerido que o MMA induza convulsões pela inibição da succinato desidrogenase, muito pouco se sabia sobre a contribuição da hiperamonemia para o desenvolvimento das convulsões nestes pacientes, uma vez que a hiperamonemia está associada com convulsões em uma série de condições patológicas, e é um frequente achado nos pacientes com hiperamonemia (Scriver, 1995).

Em face a estas questões decidiu-se, no presente estudo, avaliar os efeitos dos íons amônio sobre a ação convulsivante do MMA e sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase e sua inibição pelo MMA. Investigou-se a hipótese de que, mesmo em níveis subconvulsivantes, a amônia pudesse contribuir na gênese dos episódios convulsivos induzidos pelo MMA em ratos e se alteraria a atividade da enzima SDH ou a inibição que o MMA causa sobre a sua atividade *in vitro*.

Os resultados obtidos demonstraram que a administração subcutânea de 1,5 mmol/kg de acetato de amônio (íons amônio), dose escolhida por não induzir convulsão nos animais injetados,

potencializou o efeito convulsivante que a dose de 3 μmol de MMA provoca quando injetado unilateralmente nos estriados de ratos.

A partir destes resultados, investigou-se a hipótese de que a potencialização que a amônia causou sobre os efeitos do MMA era devido a alguma forma de inibição direta sobre a atividade da enzima SDH, uma vez que têm sido demonstrado que este composto inibe algumas enzimas do ciclo de Krebs (Lai & Cooper, 1991). Para testar esta hipótese, foi verificado se a adição de cloreto de amônio (íons amônio) produzia algum efeito sobre a atividade basal da enzima *in vitro*. É importante salientar que, neste experimento, não foi utilizado acetato de amônio, conforme foi utilizado no tratamento *in vivo*, porque segundo alguns autores (Robinson & Weiner, 1981) os íons acetato induzem ativação da atividade da SDH *in vitro*.

Em substituição ao acetato de amônio, foi utilizado o cloreto de amônio, embora alguns autores considerem este composto como um leve ativador, porém de potência bem inferior em relação ao acetato (Kearney et al., 1974). Para excluir uma possível interferência do íon cloreto, foi utilizado como controle o composto cloreto de potássio, uma vez que não há indícios na literatura de que o íon potássio provoque alguma alteração na atividade da enzima. De fato, a adição do íon cloreto não interfere na atividade da succinato desidrogenase (Figura 16). Da mesma forma, a adição de íons amônio não tem efeito sobre atividade basal da SDH *in vitro* nas concentrações utilizadas (figura 16).

Partindo dos resultados obtidos até então, verificou-se se a amônia potencializaria a inibição que o MMA causa sobre a atividade

da enzima *in vitro*. Para o cumprimento dos objetivos propostos, num primeiro momento, foi testada a atividade da enzima frente à determinadas concentrações de MMA, onde foi de fato, verificada a inibição da enzima pelo ácido. É importante ressaltar que o MMA só inibiu a atividade da enzima na presença de fenasina. Quando foi utilizado somente o DCIP no meio reacional, como acceptor de elétrons, a enzima apresentou atividade basal adequada, porém não apresentava inibição pelo MMA (dados não mostrados). Somente foi observada inibição da enzima quando foi acrescentado fenasina ao meio reacional. A fenasina é um composto oxidante (Gutman & Silman, 1975), e tem sido sugerido que ele oxide a enzima, levando-a a uma conformação espacial mais suscetível à inibição pelo MMA. Segundo Gutman & Silman (1975), quando a enzima encontra-se no seu estado reduzido torna-se mais ativa, o que é verificado quando são adicionados ao meio reacional alguns compostos redutores. Por outro lado, quando num estado oxidado, a enzima torna-se menos ativa e mais suscetível a diversos inibidores (Gutman & Silman, 1975). Este fato pode ser de grande importância no entendimento da fisiopatologia dos episódios convulsivos na acidemia metilmalônica, uma vez que na doença, quando os pacientes apresentam as crises de descompensação metabólica que culminam em convulsões, podem haver alterações no estado redox dos tecidos e isso contribuir para que a enzima SDH fique mais suscetível à inibição pelo MMA e assim desencadear um processo que resulta em prejuízo ao metabolismo energético e em última instância, dano celular.

Depois de comprovada a inibição da enzima pelo MMA, testou-

se o efeito dos íons amônio sobre a inibição da SDH induzida pelo MMA. A adição de cloreto de amônio, nas concentrações utilizadas, não modificou a inibição da enzima pelo MMA (figura 17, 18 e 19).

Portanto, pode-se sugerir que os efeitos tóxicos induzidos pela amônia, e que contribuem na gênese das convulsões induzidas pela injeção de MMA, provavelmente não sejam decorrentes de interferência adicional na atividade da SDH.

Tem sido proposto que a amônia inibe a recaptação de glutamato e leva a um aumento na concentração extracelular deste neurotransmissor (Felipo et al., 1994, Zhou & Noremborg, 1999), o que leva à ativação nos receptores glutamatérgicos NMDA (Madl & Burgesser, 1993). A ativação destes receptores têm sido associada com a depleção de ATP induzida pela amônia, geração de radicais livres e neurotoxicidade (Felipo et al., 1994; Felipo et al., 1999; Kosenko et al., 1997). A amônia e o glutamato induzem a conversão da enzima Na^+ , K^+ -ATPase para o estado ativo (desfosforilado) (Marcaida et al., 1996), o que leva à depleção de ATP devido ao aumento do consumo deste nucleotídeo. Segundo alguns autores, a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase cerebral está aumentada no cérebro de ratos com síndromes hiperamonêmicas congênitas ou adquiridas (Ratnakumari et al., 1995). Além disso, têm sido demonstrado que a amônia inibe algumas enzimas do ciclo de Krebs (Lai & Cooper, 1991), potencializa o efeito inibitório de vários ésteres de CoA sobre a atividade da α -cetoglutarato desidrogenase (McNaught et al., 1995), inibe a lançadeira malato-aspartato (Siegel et al., 1994) e induz edema mitocondrial em astrócitos devido ao acúmulo excessivo de glutamina

(Dolinska et al., 1996) e alterações mitocondriais em neurônios como acúmulo de cálcio no interior destas organelas (Kosenko et al., 2000, Dolinska, et al., 1985) o que contribui para a depleção de ATP (Dolinska et al., 1996). A depleção de ATP induzida pelo glutamato tem sido também causamente relacionada à despolarização e disfunção mitocondrial, devido a acúmulo excessivo de Ca^{2+} na matriz e ativação do poro de transição de permeabilidade, o qual colapsa o $\Delta\psi$ (Schinlder et al., 1996; White & Reynolds, 1996), um efeito que pode ser compartilhado pela amônia, uma vez que ela provoca acúmulo extracelular de glutamato (Felipo et al., 1994).

Em 1993, foi demonstrado que o MMA inibe a atividade da SDH *in vitro* (Dutra et al., 1993) e que tal inibição pode ser o evento primário no efeito convulsivante da injeção intraestriatal de MMA, o qual é bloqueado pelo MK-801 (Mello et al., 1996). Estes resultados estão de acordo com a hipótese de que a inibição da SDH por inibidores competitivos e não-competitivos causam depleção de ATP primária e excitotoxicidade secundária (Greene et al., 1993; Greene et al., 1995; Greene et al., 1996). O envolvimento de geração de radicais livres na ação convulsivante do MMA é indicado pelo achados que o MMA induz a produção de radicais livres *in vitro* (Fontella et al., 2000) e que o ascorbato e o α -tocoferol diminuem as convulsões induzidas pelo MMA. (Fighera et al., 1999). De fato, vários estudos têm sugerido que a geração de radicais livres pode ser uma rota final no dano excitotóxico (Alexi et al., 1998) uma vez que a administração de MK-801 e antioxidantes revertem os efeitos neurotóxicos de inibidores da SDH, mas não a depleção de ATP. (Schulz et al., 1995).

O fato de que o MK-801 reverte a depleção de ATP induzida pela amônia, mas não a induzida por inibidores da SDH, sugere que a depleção de ATP induzida por estas toxinas ocorra como consequência de diferentes mecanismos neuroquímicos básicos. Contudo, é possível que estas neurotoxinas possam ter sinergicamente causado um aumento na excitabilidade celular decorrente desta depleção de ATP. Por outro lado, considerando que a amônia e o MMA aumentam a produção de radicais livres (Felipo et al., 1999; Fontella et al., 2000) e que radicais livres têm sido implicados na gênese do fenômeno convulsivo (Hiramatsu et al., 1996; Murashima & Suzuki; 1998), é possível que a potencialização da produção de radicais livres pela simultânea injeção destes compostos possa ser responsável pelo aumento nas convulsões induzidas pelo MMA.

Em resumo, o presente estudo descreveu a potencialização da ação convulsivante do MMA pela amônia, um efeito que não parece ser devido à potencialização da inibição da SDH pelo MMA. Embora não sejam conhecidos os mecanismos de interação entre amônia e MMA, o presente achado pode ser de grande valor na compreensão da fisiopatologia dos sintomas neurológicos observados na acidemia metilmalônica e pode contribuir para o estabelecimento de novas condutas para o tratamento dos pacientes afetados, proporcionando uma diminuição nos níveis séricos aceitáveis para pacientes metilmalonicacidêmicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKRELL, B.A.C.; KEARNEY, E.B.; MAYR, M. Role of oxalacetate in the regulation of mammalian succinate dehydrogenase. Journal of Biological Chemistry **249**: 2021-2027, 1974.

ALEXI, T.; HUGHES, P.E.; FAULL, R.L. AND C.E. WILLIAMS. 3-Nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathways of neurodegeneration. NeuroReport **9**: R57-R64, 1998.

ALGER, B.E. & NICOLL, R.A. Ammonia does not selectively block IPSPs in rat hippocampal pyramidal cells. Journal Neurophysiology **49**: 1381-1391, 1983.

ALLERT, N.; KÖLLER, H.; SIEBLER, M. Ammonia-induced depolarization of cultured rat cortical astrocytes. Brain Research **782**: 261-270, 1998.

ANDO, T.; RASSMUSSEN, K.; NYHAN, W.L.; DONNELL, G.N.; BARNES, N.D. Propionic acidemia in patients with ketotic hyperglycinemia. Journal of Pediatrics **78**: 827-832, 1971.

ARMSTRONG, D.L. Calcium channel regulation by calcineurin, a Ca²⁺-activated phosphatase in mammalian brain. Trends in Neuroscience **12**: 117-122, 1989.

BARZILAY, Z.; BRITTEN, A.G.; KOEHLER, R.C.; DEAN, J.M.; TRAYSTMAN, R.J. Interaction of CO₂ and ammonia on

cerebral blood flow and O₂ consumption in dogs. American Journal Physiology **248** (*Heart Circ.Physiol.* 17): H500- H506, 1985.

BEAL, M.F. Neurochemical and histological characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. The Journal of Neuroscience **13**: 4181-4192, 1993.

BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J.; MARSHALL, P.M.; FREEMAN, B.A. Apparent radical hydroxy radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proceedings of The National Academy of Sciences USA **87**: 1621-4, 1990.

BEHRENS, M.I.; J.; CANZIONERO, L.M.T.; SENSI, S.L.; CSERNANSKY, C.A.; CHOI, D.W. 3-Nitropropionic acid induces apoptosis in cultured striatal and cortical neurons. NeuroReport **6**: 545-548, 1995.

BENDER, A.S. & NOREMBERG, M.D. Effect of ammonia on GABA uptake and release in cultured astrocytes. Neurochemistry International **36**: 389-395, 2000.

BOSMAN, D.K.; DEUTZ, N.E.P.; MAAS, M.A.W.; VAN EIJK, H.M.H.; SMIT, J.J.H.; HAAN, J.G.; CHAMULEAU, R.A F.M. Amino acid release from cerebral cortex in experimental acute liver failure, studied by *in vivo* cerebral cortex microdialysis. Journal of Neurochemistry **59** (2) 591-599, 1992.

BRADFORD, H.F. & WARD, H.K. Glutamine as a metabolic substrate for isolated nerve-endings: inhibition by ammonium ions. Biochemical Society Transactions **3**: 1223-1226, 1975.

BRADFORD, H.F. & WARD, H.K. On glutaminase activity in mammalian synaptosomes. Brain Research **110**: 115-125, 1976.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry **72**: 248-254, 1977.

BRAGANÇA, B.M.; FAULKNER, P.; QUASTEL, J.H. Effects of inhibitors of glutamine synthesis on the inhibition of acetylcholine synthesis in brain slices by ammonium ions. Biochimica et Biophysica Acta **10**: 83-88, 1953.

BRISMAR, J. & OZAND, P.T. CT and MR of the brain in the diagnosis of organic acidemias. Experience from 107 patients. Brain & Development **16**:104-124, 1994.

BRORSON, J.R.; MARCUCCILLI, C.J.; MILLER, R.J. Delayed antagonism of calpain reduces excitotoxicity in cultured neurons. Stroke **26**: 1259-67, 1995.

BROUILLET, E; HENSHAW, D.R.; SCHULZ, J.B.; BEAL, M.F. Aminooxyacetic acid striatal lesions attenuated by 1,3-butanediol and coenzyme-Q10. Neuroscience Letters **177**: 58-62, 1994.

BROUILLET, E; GUYOT, M-C.; MITTOUX, V.; ALTAIRAC, S.; CONDÉ, F.; PALFI, S.; HANTRAYE, P. Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. Journal of Neurochemistry **70**: 794-805, 1998.

BURNS, L.H.. Selective putaminal excitotoxic lesions in non-human primates model the movement disorder of Huntington disease. Neuroscience **64**: 1007-1017, 1995.

BUSANSKA, L.; ZABLOCKA, B.; DYBEL, A.; DOMANSKA-JANIK, K.; ALBRECHT, J. Delayed induction of apoptosis by ammonia in C6 glioma cells. Neurochemistry International **37**: 287-297, 2000.

BUTTERWORTH, R.F.; LE, O, LAVOIE, J.; SZERB, J. Effect of portacaval anastomosis on electrically stimulated release of glutamate from rat hippocampal slices. Journal of Neurochemistry **56**: 1481-1484, 1991.

CARDINALE, G.J.; CARTY T.J.; ABELES R.H. Effect of methylmalonil coenzyme A, a metabolite wich accumulates in vitamin B₁₂ deficiency, on fatty acid synthesis. The Journal of Biological Chemistry **245**: 3771-5, 1970.

CHAN, P.H. Effects of excitatory neurotransmitter amino acids on swelling of rat brain cortical slices. Journal of Neurochemistry **33**: 1309-15, 1979.

CHEEMA-DHADLI, S.; LEZNOFFC, C.; HALPERIN, M.L. Effect of methylcitrate on citrate metabolism: implications for the management of patients with propionic acidemia and methylmalonic aciduria. *Pediatric Research* **9**: 905-908, 1975.

COOPER, A L. & PLUM, F. Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiological Reviews* **67**, nº 2: 440- 519, 1987.

COUDE, F.X.; SWEETMAN, L.; NYHAN W.L. Inhibition by propionil-coenzyme A of N-acetylglutamate synthetase in rat liver mitochondria. *Journal of Clinical Investigation* **64**: 1544-1551, 1979.

COYLE, J.T. & PUTTERFACKEN, P.: Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* **264**: 689-95, 1993.

CRUZ, N.F. & DUFFY, T.E. LOCAL cerebral glucose metabolism in rats with chronic portacaval shuntz. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **3**: 311-320, 1983.

DANIELSSON, H.: Present status of research on catabolism and excretion of cholesterol. *Advances in Lipid Research* **1**: 335, 1963.

DOLINSKA, M.; HILGIER, W.; ALBRECHT, J. Ammonia stimulates glutamine uptake to the cerebral non-synaptic mitochondria of the rat. *Neuroscience Letters* **213**: 45-48, 1996.

DREWES, L.R. & R.L LEINO. Neuron-specific mitochondrial degeneration induced by hyperammonemia and octanoic acidemia. *Brain Research* **340**: 211-218, 1985.

DUFFY, T.E.; NELSON, S.R.; LOWRY, O.H. Cerebral carbohydrate metabolism during acute hypoxia and recovery Journal of Neurochemistry **19**: 959-977, 1972.

DUTRA, J.C.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.G.; WANNMACHER, C.M.D. Methylmalonate increases glucose uptake *in vitro* by brain of young rats. Biochemical Society Transactions **17**: S72-S73, 1989.

DUTRA, J.C.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.F.; DUTRA-FILHO, C.; WANNMACHER, C.M.D. Effects of methylmalonate and propionate on uptake of glucose and ketone bodies *in vitro* by brain of developing rats. Biochemical Medicine and Metabolism Biology **45** : 56-64, 1991.

DUTRA, J.C. Efeito do metilmalonato e do propionato sobre parâmetros bioquímicos do metabolismo intermediário cerebral de ratos jovens. 1992. 192f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná em convênio com o Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Curitiba, 1992.

DUTRA, J.C.; DUTRA-FILHO, C.; CARDOSO, S.E.C.; WANNMACHER, C.M.D.; SARKIS, J.J.F.; WAJNER, M. Inhibition of succinate dehydrogenase and beta-hydroxybutyrate dehydrogenase activities by methylmalonate in brain and liver of developing rats. Journal of Inherited Metabolic Disease **16**: 147-53, 1993.

DYCKENS, J.A. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria

produce free-radicals when exposed to elevated Ca^{2+} and Na^+ : implications for neurodegeneration. Journal of Neurochemistry **63**: 584-91, 1994.

EZAWA, I. & OGATA, E. Ca^+ -induced activation of succinate and the regulation of mitochondrial oxidative reactions. Journal of Biochemistry **85**: 65-74, 1979.

FELIPO, V.; GRAU, E.; MIÑANA, M.D.; GRISOLÍA, S. Hyperammonemia decreases protein kinase C-dependent phosphorylation of microtubule-associated protein 2 and increases its binding to tubulin. European Journal Biochemistry **214**: 243-249, 1993.

FELIPO, V.; KOSENKO, E.; MIÑANA, M.D.; MARCAIDA, G.; GRISOLÍA, S. Molecular mechanism of acute ammonia toxicity and of its prevention by L-carnitina. Advances in Experimental Medicine and Biology **368**: 65-77, 1994.

FENTON, W.A & ROSEMBERG, L.E.: Disorders of propionate and methylmalonate metabolism, In: The Metabolic Basis of Inherited Disease, SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L.; SLY, W.S. and VALLE, D. eds. 7^a ed, New York, McGraw-Hill, p. 1423-49, 1995.

FERENCI, P.; JACOBS, R.; PAPPAS,S.C.; SCHAFFER, D.F. JONES, E.A. Enzymes of cerebral GABA metabolism and synaptosomal GABA uptake in the rabbit: evidence for a decreased cerebral GABA-transaminase activity. Journal of Neurochemistry **42**:

1487-1490, 1984.

FERENCI, E.; KLEINBERGER, G.; SCHAFER, D.F.; HOOFNAGLE, J.H.; JONES, E.A. Serum levels of γ -aminobutyric acid-like activity in acute and chronic hepathocellular disease. Lancet **2**: 811-814, 1983.

FIGHERA, M.R.; MELLO, C.F.; WAJNER, M.; FRUSSA-FILHO, R.; QUEIROZ, C.M.; STRACKE, M.P.; NIN BRAUER, M.C.; GONZÁLEZ-RODRÍGUES, L.L. Ascorbic acid and α -tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsions. NeuroReport **10**: 2039-2043, 1999.

FITZPATRICK, S.M.; COOPER, A.J.L.; DUFFY, T.E. Use of β -methylene-D,L-aspartate to assess the role of aspartate aminotransferase in cerebral oxidative metabolism. Journal of Neurochemistry **41**: 1370-1383, 1983.

FONTELLA, F.U.; PULROLNIK, V.; GASSEN, E.; WANNMACHER, C.M.D.; KLEIN, A.B.; WAJNER, M.; DUTRA-FILHO, C.S. Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. NeuroReport **11**: 541-544, 2000.

FRANKEL, E.P.; KITCHENS, R.L.; JOHNSON, J.M. The effect of vitamin B12 deprivation on the enzymes of fatty acid synthesis. Journal of Biological Chemistry **248**: 7540-7546, 1973.

GJEDDE, A.; LOCKWOOD, A.H.; DUFFY, T.E.; PLUM, F. Cerebral blood flow and metabolism in chronically hyperammonemic

rats: effect of an acute ammonia challenge. Annals of Neurology **3**: 325-330, 1978.

GEMBA, T.; OSHIMA, T.; NINOMIYA, M.: Glutamate efflux via the reversal of the sodium-dependent glutamate transporter caused glycolytic inhibition in rat cultured astrocytes. Neuroscience **63**: 789-795, 1994.

GLASGOW, A.M. & H.P. CHASE. Effects of propionic acid on fatty acid oxidation and ureagenesis. Pediatric Research **10**: 683-690, 1976.

GREENE, J.G.; PORTER, L.; ELLER, R.V.; GREENAMYRE, J.T. Inhibition of succinate dehydrogenase by malonic acid produces an "excitotoxic" lesion in rat striatum Journal of Neurochemistry **61**: 1151-1154, 1993.

GREENE, J.G. & GREENAMYRE, J.T. Characterization of the excitotoxic potential if the reversible succinate dehydrogenase inhibitor malonate. Journal of Neurochemistry **64**:430-436, 1995.

GREENE, J.G. & J.T. GREENAMYRE. Manipulation of membrane potential modulates malonate-induced striatal excitotoxicity *in vivo*. Journal of Neurochemistry **66**: 637-643, 1996.

GUTMAN, M. & SILMAN, N. The steady state activity of succinate dehydrogenase in the presence of opposing effectors. I. The effect of L malate and CoQH₂ on the enzyme activity. Molecular and Cellular Biochemistry **7**: 51-58, 1975.

HALPERIN, M.L.; SCHILLER, C.M.; FRITZ, I.B. The inhibition by methylmalonic acid of malate transport by the dicarboxylate carrier in rat liver mitochondria. Journal of Clinical Investigation **50**: 2276-2282, 1971.

HARRIS, M.E.; CARNEY, J.M.; COLE, P.S.; HENSLEY, K.; HOWARD, B.J.; MARTIN, L.; BRUMMER, P.; WANG, Y.; PEDIGO, N.W.; BUTTERFIELD, D.A. β -amyloid peptide-derived, oxygen-dependent free radicals inhibit glutamate uptake in cultured astrocytes: implications for Alzheimer's disease. NeuroReport **6**: 1875-1879, 1995.

HASSEL, B. & SONNEWALD, U.: Selective inhibition of the tricarboxylic acid cycle of GABAergic neurons with 3-nitropropionic acid *in vivo*. Journal of Neurochemistry **65**: 1184-1191, 1995.

HAWKINS, R.A.L.; MILLER, A.L.; NIELSEN, R.C.; VEECH, R.L. The acute action of ammonia on rat brain metabolism *in vivo*. Biochemical Journal **134**: 1001-1008, 1973.

HAYASAKA, K.; METOKI, K.; SATOH, T.; NARISAWA, K.; TADA, K.; KAWAKAMI, T.; MATSUO, N.; AOKI, T. Comparison of cytosolic and mitochondrial enzyme alterations in the livers of propionic or methylmalonic acidemia: a reduction of cytochrome oxidase activity. Tohoku Journal of Experimental Medicine **137**: 329-34, 1982.

HEDERSTEDT, L. & HEDÉN, L. New properties of *Bacillus subtilis* succinate dehydrogenase altered at the active site. The

apparent active site thiol of succinate oxidoreductases is dispensable for succinate oxidation. Biochemical Journal **260**: 491-497, 1989.

HICKS, R.R.; SMITH, D.H.; GENNARELLI, T.A, McINTOSH, T. Kynurenate is neuroprotective following experimental brain injury in the rat. Brain Research **655** : 91-96, 1994.

HILLMAN, R.E. & OTTO, E.F. Inhibition of glycine-serine interconversion in cultured human fibroblasts by products of isoleucine catabolism. Pediatric Research **8**: 941-5, 1974.

HINDFELT, B.; PLUM, F.; DUFFY, T.E.: Effect of acute ammonia intoxication on cerebral metabolism in rats with portacaval shunts. Journal of Clinical Investigation **59**: 386-396, 1977.

HIRAMATSU, M.; NAKAJIMA, M.; KOMATSU, M. Electron spin resonance-computed tomography: Brain imaging and epilepsy. In Free Radicals in Brain Physiology and Disorders (L. Packer, M. Hiramatsu, T. Yoshikawa, Eds.), pp. 185-195, Academic Press, San Diego, 1996.

ISCHIROPOULOS, H.; ZHU, L.; CHEN, J.; TSAI, M.; MARTIN, J.C.; SMITH, C.D.; BECKMAN, J.S. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. Archives of Biochemistry and Biophysics **298**: 431-437, 1992.

JAMES, I.M.; MACDONNELL, L.; XANALATOS, C. Effect of ammonium salts on brain metabolism. Jornal Neurology Neurosurgery and Psychiatry **37**: 948-953, 1974.

JAMES, J.H.; ESCOURROU, J.; FISHER, J.E. Blood-brain neutral amino acid transport activity is increased after portacaval anastomosis. Science **200**: 1395-1397, 1978.

JAMES, J.H.; JEPPSSON, B.; ZIPARO, V.; FISCHER, J.E. Hyperammonaemia, plasma amino acid imbalance, and blood-brain amino acid transport: a unified theory of portal-systemic encephalopathy. Lancet **2**: 772-775, 1979.

JENNER, P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. Lancet **344**: 796-8, 1994.

JONES, E.A., GAMMAL, S.H. Hepatic ancephalopathy, in THE LIVER: BIOLOGY AND PATHOBIOLOGY (Arias I.W. and Popper H., eds), pp. 985-1007. Raven Press, New York, 1988.

KANAMORI, K. & ROSS, B.D. Glial alkalinization detected *in vivo* by ^1H - ^{15}N heteronuclear multiple-quantum coherence-transfer NMR in severely hyperammonemic rat. Journal of Neurochemistry **68**: 1209-1220, 1997.

KEARNEY, E.B.; ACKRELL, B.A.C.; MAYR, M.; SINGER, T.P. Activation of succinate dehydrogenase by anions and pH. The Journal of Biological Chemistry **249**: 2016-2020, 1974.

KENNEY, W.C. The reaction of N-ethylmaleimide at the active site succinate dehydrogenase. The Journal of Biological Chemistry **250**: 3089-3094, 1975.

KINDT, G.W.; BROCK, M.; ALTENAU, L.L.; PÖLL, W.

Blood/brain barrier and brain edema in ammonia intoxication. Lancet **1**: 201, 1977.

KOSENKO, E.; KAMINSKY, Y.; FELIPO, V.; MIÑANA, M.-D.; GRISOLÍA, S.: Chronic hyperammonemia prevents changes in brain energy and ammonia metabolites induced by acute ammonia intoxication. Biochemica Biophysica Acta **1180**: 321-26, 1993.

KOSENKO, E.; KAMINSKY, Y.; GRAU, E.; MIÑANA, M.-D.; GRISOLÍA, S.; FELIPO, V.: Nitroarginine, an inhibitor of nitric oxido synthetase, attenuates ammonia toxicity and ammonia-induced alterations in brain metabolism. Neurochemical Research **4**: 451-56, 1995.

KOSENKO, E.; KAMINSKY, Y.; GRAU, E.; MIÑANA, M.-D.; MARCAIDA, G.; GRISOLÍA, S.; FELIPO, V.: Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and of Na⁺,K⁺-ATPase. Journal of Neurochemistry **63**: 2172-78, 1994.

KOSENKO, E.; KAMINSKY, Y.; KAMINSKY, A.; VALENCIA, M.; LEE, L.; HERMENEGILDO, C.; FELIPO, V.: Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. Free Radical Research **27**: 637-644, 1997.

KOSENKO, E.; KAMINSKI, Y.; LOPATA, O.; MURAVYOV, N.; FELIPO, V.: Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication. Free Radical Biology and Medicine **26**: 1369-1374, 1999.

KOSENKO, E.; KAMINSKY, Y.; STAVROSKAYA, I.G.; FELIPO, V. Alteration of mitochondrial calcium homeostasis by ammonia-induced activation of NMDA receptors in rat brain *in vivo*. Brain Research **880**: 139-146, 2000.

KOTLYAR, A.B. e VINOGRADOV, A.D. Sulphate ion-induced slow transformation of succinate dehydrogenase. Biochemica et Biophysica Acta **747**: 182-185, 1983.

KURIYAMA, K.; ROBERTS, E.; VOS, J. Some characteristics of binding of γ -aminobutyric acid and acetylcholine to a synaptic vesicle fraction from mouse brain. Brain Research **9**: 231-252, 1968.

LAI, J.K. & COOPER, A.J.L. Brain α -ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. Journal of Neurochemistry **47**: 1376-1386, 1986.

LAI, J.C.K.; MURTHY, Ch.R.K.; COOPER, A.J.L.; HERTZ, E.; HERTZ, L. Differential effects of ammonia and β -methylene-DL-aspartate on metabolism of glutamate and related amino acids by astrocytes and neurons in primary culture. Neurochemical Research **14** (4): 377-389, 1989.

LAI, C.K. & A. J.L COOPER. Neurotoxicity of ammonia and fatty acids: differential inhibition of mitochondrial dehydrogenases by ammonia and fatty acyl coenzyme A derivatives. Neurochemical Research **16**: 795-803, 1991.

LAURSEN, H.; SCHRØDER, H.; WESTGAARD, E. The

effect of portocaval anastomosis on the permeability to horseradish peroxidase of cerebral vessels of the rat. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica **83**: 266-268, 1975.

LAURSEN, H.; WESTGAARD, E. Enhanced permeability to horseradish peroxidase across cerebral vessels of rat after portocaval anastomosis. Neuropathology and Applied Neurobiology **3**: 29-43, 1977.

LEHNINGER, A.L. Princípios de bioquímica. 2ª ed, São Paulo, Sarvier eds, 1995.

LÊ-QUÔC, K.; LÊ-QUÔC, D.; GAUDEMER, Y. Evidence for the existence of two classes of sulfhydryl groups essential for membrane-bound succinate dehydrogenase activity. Biochemistry **20**: 1705-1710, 1981.

LIPTON, S.A. & ROSENBERG, P.A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. New England Journal of Medicine **330**: 613-22, 1994.

LOCKWOOD, A.H.; GINSBERG, M.D.; BUTLER, C.M.; GUTIERREZ, M.T. Selective effects of ammonia on regional brain glucose metabolism (abstr.). Annals of Neurology **12**: 114, 1982.

LUDOLPH, A.C.; HE, F.; SPENCER, P.S.; HAMMERSTAD, J.; SABRI, M. 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. Canadian Journal of Neurological

Sciences **18**: 492-8, 1992.

LUDOLPH, A.C.; RIEPE, M.; ULLRICH, K. Excitotoxicity, energy metabolism and neurodegeneration. Journal of Inherited Metabolic Disease **16**: 716-23, 1993.

MADL, J.E. & BURGESSER, K. Adenosine triphosphate depletion reverses sodium-dependent, neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices. The Journal of Neuroscience **13**: 4429-44, 1993.

MANS, AM.; SAUNDERS, S.J.; KIRSCH, R.E.; BIEBUYK, J.F. Correlation of plasma and brain amino acids and putative neurotransmitter alterations during acute hepatic coma in the rat. Journal of Neurochemistry **32**: 285-92, 1979.

MANS, A.M.; BIEBUYCK, J.F.; SHELLY, K.; HAWKINS, R.A. Regional bloodbrain barrier permeability to amino acids after portacaval anastomosis. Journal of Neurochemistry **38**: 705-717, 1982.

MANS, A.M.; BIEBUYCK, J.F.; DAVIS, D.W.; BRYAN, R.M.; HAWKINS, R.A. Regional cerebral glucose utilization in rats with portacaval anastomosis. Journal of Neurochemistry **40**: 986-991, 1983.

MANS, A.M.; BIEBUYCK, J.F.; HAWKINS, A. Ammonia selectively stimulates amino acid transport across blood-brain barrier. Journal of Physiology **245**: C74-C77, 1983.

MANS, AM.; DEJOSEPH, M.R.; DAVIS, D.W.; VINA, J.R.; HAWKINS, R.A Early establishment of cerebral dysfunction after portacaval shunting. American Journal Physiology **259**, E104-E110, 1990.

MARCAIDA, G.; FELIPO, V.; HERMENEGILDO, C.; MIÑANA, M.D.; GRISOLÍA, S. Acute ammonia toxicity is mediated by the NMDA type of glutamate receptors. FEBS Letters **296**: 67-68, 1992.

MARCAIDA, G.; KOSENKO, E.; MIÑANA, M.D.; GRISOLÍA, S.; FELIPO, V. Glutamate induces a calcineurin-mediated dephosphorylation of Na⁺, k⁺-ATPase that results in its activation in cerebellar neurons in culture. Journal of Neurochemisrty **66**: 99-104, 1996.

McDONALD, J.W. & SCHOEPP, D.D. Aminooxyacetic acid produces excitotoxic brain injury in neonatal rats. Brain Research **624**: 239-44, 1993.

McNAUGHT, K.S.P.; ALTOMARE, C.; CELLAMARE, S.; CAROTTI, A.; THULL, U.; CARRUPT, P.A, TESTA, P.J.; MARSDEN, C.D. Inhibition of α -ketoglutarate dehydrogenase by isoquinoline derivates structurally related to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyri-dine (MPTP). NeuroReport **6**: 1105-1108, 1995.

MELLO, C.F.; BEGNINI, J.; JIMÉNEZ-BERNAL, R.E.; RUBIN, M.A.; DE BASTIANI, J.; DA COSTA, E.; JR.; M.

WAJNER, M. Intrastratial methylmalonic acid administration induces rotational behavior and convulsions through glutamatergic mechanisms. Brain Research **721**: 120-125, 1996.

MULLEN, K.D.; SZAUTER, K.M.; KAMINSKY-RUSS, K. Endogenous benzodiazepine activity in body fluid of patients with hepatic encephalopathy. Lancet **336**: 81-83, 1990.

MUNTZ, J.A. & HURWITZ, J. The effect of ammonium ions upon isolated reactions of the glycolytic scheme. Archives of Biochemistry and Biophysics **32**: 137-149, 1951.

MURASHIMA, Y. L.; KASAMO, K.; SUZUKI, J. Antiepileptic effects of allopurinol on El mice are associated with changes in SOD isoenzyme activities. Epilepsy Research **32**: 254-265, 1998.

NATHANSON, J.A.; SCAVONE, C.; SCANLON, C.; MCKEE, M. The cellular sodium pump as a site of action for carbon monoxide and glutamate: a mechanism for long-term modulation of cellular activity. Neuron **14**: 781-94, 1995.

NOREMBERG, M.D.; BAKER, L.; NOREMBERG, L-O.B.; BLICHARSKA, J. Ammonia-induced astrocyte swelling in primary culture. Neurochemical Research **16**: 833-836, 1991.

OBERHOLZER V.C.; LEVIN, B.; BURGESS, E.A.; YOUNG, W.F. Methylmalonic aciduria. An inborn error of metabolism leading to chronic metabolic acidosis. Archives of Diseases of Childerood **42**:

492-504, 1967.

OGIER, H.; CHARPENTIER, C.; SAUDUBRAY, J.H.: Organic acidemias, In: FERNANDES J.; SAUDUBRAY J.M.; TADA K. Eds. Inborn Metabolic Diseases 1º ed. Berlim, Springer-Verlag, p. 271-99, 1990.

PARKER, T.H.; ROBERTS, R.K.; VOORHEES, C.V.; SCHMIDT, D.E.; SCHENKER, S. The effect of acute and subacute ammonia intoxication on regional cerebral acetylcholine levels in rats. Biochemical Medicine **18**: 235- 244, 1977.

PATEL M.S.; OWEN, O.E.; RAEFSKY, C. Effect of methylmalonate in developing rat brain. Life Sciences **19**: 41-8, 1976.

PAVLAKOVIC, G.; EYER, C.L.; ISOM, G.E. Neuroprotective effects of PKC inhibition against chemical hypoxia. Brain Research **676**: 205-11, 1995.

PLAITAKIS, A. & CONSTANTAKAKIS, E. Altered metabolism of excitatory amino acids, N-acetyl-aspartate and N-acetyl-glutamate in amyotrophic lateral sclerosis. Brain Research Bulletin **30**: 301-306, 1993.

POSNER, J.B. & PLUM, F. The toxic effects of carbon dioxide and acetazolamide in hepatic encephalopathy. Journal Clinical Investigation **39**: 1246-1258, 1960.

RATNAKUMARI, L.; AUDET, R.; QURESHI, I.A.; BUTTERWORTH, R.F. Na⁺, k⁺-ATPase activities are increased in

brain in both congenital and acquired hyperammonemic syndromes. Neuroscience Letters **197**: 89-92, 1995.

ROBINSON, J.J. & WEINER, J.H. The effects of anions on fumarate reductase isolated from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. Biochemical Journal **199**: 473-477, 1981.

ROSENOW, F.; HERHOLZ, K.; LANFERMANN, H.; WEUTHEN, G.; EBNER, R.; KESSLER, J.; GHAEMI, M.; HEISS, W.-D. Neurological sequelae of cyanide intoxication - The patterns of magnetic resonance imaging, and positron emission findings. Annals of Neurology **38**: 825-828, 1995.

ROTHMAN, S.M. Excitotoxins: possible mechanism of action. Annals of The New York Academy of Sciences **648**: 132-139, 1992.

ROTHSTEIN, J.D.; JIN, L.; DYKES-HOBERG, M.; KUNCL, R.W. Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. Proceedings of The National. Academy of Sciences USA **90**: 6591-5, 1993.

SADASIVUDU, B.; RAO, T.I.; MURTHY, C.R. Acute metabolic effects of ammonia in mouse brain. Neurochemical Research **2**: 634-655, 1977.

SARAN, T.; HILGIER, W.; KOCKI, T.; URBANSKA, E.M.; TURSKI, W.; ALBRECHT, J. Acute ammonia treatment *in vitro* and *in vivo* inhibits the synthesis of a neuroprotectant kynurenic acid in rat cerebral cortical slices. Brain Research **787**: 348-350, 1998.

SCHENKER, S.; McCANDLESS, D.W.; BROPHY, E.; LEWIS, M.S. Studies on the intracerebral toxicity of ammonia. Journal Clinical Investigation **46**: 838-848, 1967.

SCHINLDER A.F.; OLSON, E.C.; SPITZER, N.C. AND M. MONTAL. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. Journal of Neuroscience **16**: 6125-6133, 1996.

SCHULZ, J.B. & BEAL, M.F. Neuroprotective effects of free radical scavengers and energy repletion in animal models of neurodegenerative disease. Annals of The New York Academy of Sciences **765**: 100-10, 1995.

SCHULZ, J.B., BEAL, M.F. et al. Involvement of free radicals in excitotoxicity *in vivo*. Journal of Neurochemistry **64**: 2239-2247, 1995.

SCRIVER, C.R, BEAUDET, A.L.; SLY, W.S. AND VALLE, D. eds. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. Em: The Metabolic Basis of Inherited Disease, 7^a ed, New York, McGraw-Hill, p. 1423-49, 1995.

SEARS, E.S.; McCANDLESS, D.W.; CHANDLER, M.D. Disruption of the blood-brain barrier in hyperammonemic coma and the pharmacologic effects of dexamethasone and difluoromethyl ornithine. Journal of Neuroscience Research **14**: 255-261, 1985.

SIEGEL, G.J.; AGRANOFF, B.W.; ALBERS, R.W.; MOLINOFF, P.B. **Basic neurochemistry**: Molecular, cellular and

medical aspects, Raven Press, New York, 5^o ed, 1994.

SINGER, T.P.; RAMSAY, R.R.; ACKRELL, B.A. C. Deficiencies of NADH and succinate dehydrogenase in degenerative diseases and myopathies. Biochimica et Biophysica Acta **1271**: 211-219, 1995.

SKOU, C.J. Further investigations on a $Mg^{++} + Na^{+}$ -activated adenosine-triphosphatase, possibly related to the active, linked transport of Na^{+} and K^{+} across the nerve membrane. Biochimica et Biophysica Acta **42**: 6-23, 1960.

SMELTZER, S.C. & BARE, B.G. Brunner & Suddarth's textbook of medical-surgical nursing, 8^a ed, Philadelphia, USA, 825-72, 1996.

SNYDER, S.H. & BREDT, D.S. Biological roles of nitric oxide. Scientific American: 28-35, 1992.

SNYDER, S.H. & SABATINI, D.M. Immunophilins and the nervous system. Nature Medicine **1**: 32-7, 1995.

STEWART, P.M. & WALSER, M. Failure of the normal ureagenic response in organic acid loaded rats. Proposed mechanism for the hyperamonemia of propionic and methylmalonic acidemia. Journal of Clinical Investigation **66**:484-92, 1980.

SWANSON, R.A; FARRELL, K.; SIMON, R.P. Acidose causes failure of astrocyte glutamate uptake during hypoxia. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism **15**: 417-24, 1995.

TAKAHASHI, R.; NASU, T.; TAMURA, T.; KARIYA, T. Relationship of ammonia and acetylcholine levels to brain excitability. Journal of Neurochemistry **7**: 103-112, 1961.

TAN, A.; SMITH, C.M.; AOGAICHI, T.; PLAUT, G.W.E. Inhibition of D(-)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase by malonate analogs. Archives of Biochemistry and Biophysics **166**: 164-172, 1975.

THOMPSON, G.N.; WALTER, J.H.; BRESSON J-L, FORD G.C.; LYONNET S.L.; CHALMERS R.A.; SAUDUBRAY J-M, LEONARD J.V.; HALLIDAY D. Sources of propionate in inborn errors of propionate metabolism. Metabolism **39**: 1133, 1990.

UMEMURA, A.; MABE, H. ; NAGAI, H. A phospholipase C inhibitor ameliorates postischemic neuronal damage in rats. Stroke **23**: 1163-66, 1992.

UTTER, M.S. Metabolic regulation and enzyme action. Federation European Biochemical Societés Symposium **19**: 91-8, 1970.

VAN DER MEER, S.B.; POGGI, F.; SPADA, M.; BONNEFONT, J.P.; OGIER, H.; HUBERT, P.; DEPONDY, E.; RAPOPORT, D.; RABIER, D.; CHARPENTIER, C.; PARVY, P.; BARDET, J.; KAMOUN, P.; SAUDUBRAY, J.M. Clinical outcome of long-term management of patients with vitamin B₁₂-unresponsive methylmalonic acidemia. Journal of Pediatrics **125**: 903-908, 1994.

VANDENBERG, R.J. Molecular pharmacology and physiology of glutamate transporters in the central nervous system. Clinical and Experimental Pharmacology **25**: 393-400, 1998.

VIK, S.B. & HATEFI, Y. Possible occurrence and role of an essential histidyl residue in succinate dehydrogenase. Proceedings of The National Academy of Sciences USA **78**: 6749-6753, 1981.

VOORHIES, T.M.; EHRLICH, M.E.; DUFFY, T.E.; PETITO, C.K.; PLUM, F. Acute hyperammonemia in the young primate: physiologic and neuropathologic correlates. Pediatric Research **17**: 970-975, 1983.

WAJNER, M.; DUTRA, J.C.; CARDOSO, S.E.; WANNMACHER, C.M.D.; MOTTA, E.R. Effect of methylmalonate on *in vitro* lactate release and carbon dioxide production by brain of suckling rats. Journal of Inherited Metabolic Disease **15**: 92-6, 1992.

WALKER, C.O.; SPEEG, K.V. JR, LEVINSON, J.D.; SCHENKER, S. Cerebral acetylcholine, serotonin, and norepinephrine in acute ammonia intoxication. Proceedings of the Society for Experimental Biology Medicine **136**: 668- 671, 1971.

WHITE, R.J. & I.J. REYNOLDS. Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. The Journal of Neuroscience **16**: 5688-5697, 1996.

WÜLLNER, U.; YOUNG, A.B.; PENNEY, J.B.; BEAL, M.F. 3-nitropropionic acid toxicity in the striatum. Journal of Neurochemistry **63**: 1772-81, 1994.

YAMAGUCHI, M.; KURA, OKADA, S. Role of zinc as an activator of mitochondrial function in rat liver. Biochemical Pharmacology **31**: 1289-1293, 1982.

ZAKI, A.E.O.; WARDLE, E.N.; CANALESE, J.; EDE, R.J.; WILLIAMS, R. Potential toxins of acute liver failure and their effects on blood-brain barrier permeability. Experientia **39**: 988-991, 1983.

ZEEVALK, G.D.; DERR-YELLIN, E.; NICKLAS, W.J. NMDA receptor involvement in toxicity to dopamine neurons *in vitro* caused by the succinate dehydrogenase inhibitor 3-nitropropionic acid. Journal of Neurochemistry **64**: 455-8, 1995.

ZHOU, B-G. & NOREMBERG, M. D. Ammonia downregulates GLAST mRNA glutamate transporter in rat astrocyte cultures. Neuroscience Letters **276**: 145-148, 1999.

8. ANEXO

Artigo submetido à revista *Experimental Neurology*, em revisão:

Marisco, P.C; Ribeiro, M.C.P; Bonini, J.S.; Brenner, G.M.; Lima, T.T.F; Mello, C.F. **Ammonia potentiates methylmalonic acid-induced convulsions**