

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL



***EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE ARGININA SOBRE ASPECTOS
BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS
EM RATOS ADULTOS.***

ELEONORA ARAÚJO DOS REIS

ORIENTADORA

Profa. Dra. Angela Terezinha de Souza Wyse

CO-ORIENTADOR

Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas – Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica.**

Porto Alegre, 2001.

*Dedico este trabalho àqueles que sempre
acreditaram na realização deste sonho...*

... Aos Meus Pais.

"...Some dreams live on in time forever
 Those dreams you want with all your heart
 And I'll do whatever it takes
 Follow through with the promise I made
 Put it all on the line
 What I hoped for at last would be mine
 If I could reach, higher
 Just for one moment touch the sky
 From that one moment in my life
 I'm going to be stronger
 Know that I tried my very best
 I put my spirit to the test
 If I could reach higher...
 Some days are meant to be remembered
 Those days we rise above the stars
 So I'll go the distance this time
 Seeing more the higher I climb
 That the more I believe
 All the more that this dream will be mine..."

"Alguns sonhos existem no tempo para sempre
 Estes sonhos você deseja de todo coração
 E Eu farei o que for preciso, seguindo a promessa que fiz
 Coloquei tudo em ordem esperando que ele finalmente fosse meu
 Se Eu puder alcançar mais alto
 Apenas por um momento tocar o céu
 A partir desse momento em minha vida
 Eu me tornarei mais forte
 Sabendo que fiz o melhor que pude
 Que coloquei meu espírito à prova
 Se Eu puder alcançar mais alto...
 Alguns dias existem para serem lembrados
 Nestes dias vamos além das estrelas
 Então Eu irei a essa distância desta vez
 Vendo melhor à medida que subo
 E quanto mais Eu acreditar
 Mais este sonho será meu..." Gloria Estefan & Diane Warren

AGRADECIMENTOS

- ★ À querida orientadora Profa. Angela T. S. Wyse pelo incentivo, sabedoria amizade, companheirismo e “bons fluidos” tão necessários ao longo desta jornada.
- ★ À Profa. Maria da Graça Fauth, por ter me apresentado a ciência pela qual me encantei, a Bioquímica, e ter me incentivado a seguir o caminho da pesquisa científica.
- ★ À Profa. Cleide Gonçalves da Silva, por ter me oferecido a oportunidade que eu sempre havia desejado.
- ★ Ao Prof. Carlos Alexandre Netto pela co-orientação e colaboração.
- ★ Ao Prof. Iván Izquierdo e seu grupo, pela compreensão, colaboração e ensinamentos.
- ★ Ao Prof. Clóvis M.D. Wannmacher pela atenção, amizade e ensinamentos.
- ★ Aos Professores do Grupo dos Erros Inatos do Metabolismo, pela amizade com que me acolheram.
- ★ Aos bolsistas de Iniciação Científica, Leandro S. de Oliveira e Marcelo L. Lamers, pelo apoio, amizade e colaboração para a execução deste trabalho.
- ★ À colega e amiga Virgínia Cielo Rech, pela amizade, incentivo e companheirismo em todos os momentos.
- ★ Aos colegas de pós-graduação e laboratório, Zilda E. L. Pontes e Emílio L. Streck, por terem me acolhido na chegada a este grupo.
- ★ A todos os funcionários, professores, colegas e amigos que fiz neste Departamento e que, de alguma forma, participam de minha vida.
- ★ Aos meus pais, Ney e Marlene, pelo amor, dedicação, amizade, carinho e, sobretudo, pelo incentivo em todos os momentos. E também, por terem sido os meus primeiros e eternos orientadores na disciplina mais básica de todas: a vida.
- ★ Aos meus tios Daniel, Ezequiel e Gesmar pelo carinho, amizade e incentivo.
- ★ Ao meu primo e irmão Renato, por sempre estar ao meu lado.
- ★ A Deus, por ter mostrado o caminho pelo qual eu deveria seguir.

Resumo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) constituem um grupo de doenças genéticas causadas pela deficiência ou ausência de uma proteína, geralmente uma enzima.

A hiperargininemia é um erro inato do ciclo da uréia causado pela deficiência de arginase, enzima que converte a arginina em ornitina e uréia. O bloqueio desta reação resulta no acúmulo tecidual e plasmático de arginina e seus metabólitos, os compostos guanidínicos. As manifestações clínicas desta doença diferem substancialmente das demais doenças metabólicas do ciclo da uréia. Seus principais sintomas, que manifestam-se progressivamente, são caracterizados por espasticidade, epilepsia e retardo mental.

A correlação entre o metabolismo da arginina e do óxido nítrico ocorre no chamado ciclo arginina-citrulina. A arginina é o substrato para a síntese de óxido nítrico pela ação da enzima óxido nítrico sintetase (ONS). Como os pacientes hiperargininêmicos apresentam altos níveis de arginina no plasma e tecidos, é provável que, devido ao excesso deste substrato, ocorra um aumento na síntese de óxido nítrico. O óxido nítrico em concentrações elevadas está associado à produção de radicais livres, neurotoxicidade e inibição da enzima Na^+, K^+ -ATPase.

A Na^+, K^+ -ATPase é uma enzima fundamental ao funcionamento normal do sistema nervoso central (SNC), pois regula a transmissão do impulso nervoso, o volume celular e o transporte de moléculas ligadas ao cotransporte de Na^+ , tais como aminoácidos, glicose e neurotransmissores. A inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase nos sítios pré-sinápticos resulta na inibição da recaptação de glutamato, bem como na estimulação de sua liberação. A inibição desta enzima também tem sido associada a diversas neuropatologias.

A Na^+, K^+ -ATPase também está envolvida na LTP (long term potentiation – potenciação de longa duração), que é um tipo de neuroplasticidade celular que provoca alterações nas cascatas bioquímicas no SNC, que são, muitas vezes, idênticas àquelas que ocorrem durante o processo de formação da memória. Assim, acredita-se que a LTP seja um dos diversos mecanismos bioquímicos importantes para a formação da memória.

Neste estudo investigamos o efeito *in vivo* da administração aguda de arginina, L-NAME (um potente inibidor da ONS) e a co-administração de Arg + L-NAME sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase de membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos adultos e sobre testes

comportamentais utilizados para avaliar o aprendizado e memória: campo aberto e esQUIVA INIBITÓRIA.

Os resultados obtidos demonstraram que a arginina inibiu significativamente a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase de membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos. A administração de L-NAME não alterou a atividade da enzima, mas preveniu a diminuição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase causada pela arginina. Nos experimentos de comportamento foram avaliados o aprendizado, a consolidação e a evocação da memória de longa duração pela administração das soluções em três momentos diferentes. A arginina diminuiu o desempenho do teste de esQUIVA INIBITÓRIA nos três momentos, o L-NAME isoladamente não alterou o comportamento dos animais, mas quando co-administrado com a arginina aumentou a capacidade de memorização desta tarefa. Estes resultados indicam que a administração de arginina *in vivo* reduz tanto a atividade da Na^+, K^+ -ATPase como a modulação da memória em ratos, e que isso ocorreu, provavelmente, pelo aumento da síntese de óxido nítrico.

Assumindo a possibilidade de que isso possa ocorrer em pacientes com hiperargininemia, os resultados obtidos podem ser relevantes para explicar, pelo menos em parte, a disfunção neurológica associada a essa doença.

Abstract

In the present study we investigated the effect of acute administration of L-arginine (Arg) on hippocampal Na⁺,K⁺-ATPase activity and on retrieval of step-down inhibitory avoidance in adult rats. The action of L-NAME on the effects produced by Arg was also tested.

Sixty-day-old rats were treated with a single intraperitoneal injection of saline (group I, control), arginine (0.8 g/Kg) (group II), L-NAME (2 mg/Kg) (group III) or arginine (0.8 g/Kg) plus L-NAME (2 mg/Kg) (group IV).

Na⁺,K⁺-ATPase activity was significantly reduced in arginine-treated rats; this effect was prevented by L-NAME. Retrieval of the avoidance task was also significantly impaired by arginine, whereas the simultaneous injection of L-NAME prevented this effect.

Present data strongly indicates that in vivo Arg administration reduces both Na⁺,K⁺-ATPase activity and memory modulation in rats probably through NO formation.

Lista de Abreviaturas

- ★ AI: Arginase I
- ★ AII: Arginase II
- ★ AL: Argininossuccinato Liase
- ★ AR: Arginase
- ★ Arg: L-Arginina
- ★ AS: Argininossuccinato Sintetase
- ★ ATP: Adenosina Trifosfato
- ★ cDNA: DNA Complementar
- ★ CFS-I: Carbamil Fosfato Sintetase I
- ★ CG: Compostos Guanidínicos
- ★ DNA: Ácido Desoxirribonucléico
- ★ HLA: Human Leukocyte Antigen – Antígeno Leucocitário Humano
- ★ L-NAME: N^ω-nitro-L-arginine methyl ester
- ★ LTM: Long-Term Memory – Memória de Longa Duração
- ★ LTP: Long-term Potentiation – Potenciação de Longa Duração
- ★ MHC: Major Hystocompatibility Complex – Complexo de Histocompatibilidade
Principal
- ★ NMDA: N-methyl-D-aspartate
- ★ NO: Óxido Nítrico
- ★ NOS: Óxido Nítrico Sintetase
- ★ OT: Ornitina Transcarbamilase
- ★ SNC: Sistema Nervoso Central
- ★ STM: Short-Term Memory – Memória de Curta Duração
- ★ WM: Working Memory – Memória de Trabalho

Lista de Figuras

Figura 1: Representação Esquemática do Ciclo da Uréia.....	14
Figura 2: Erros Metabólicos do Ciclo da Uréia.....	18
Figura 3: Hidrólise da Arginina.....	19
Figura 4: Síntese do Óxido Nítrico.....	29
Figura 5: O Ciclo Citrulina-Óxido Nítrico e o Ciclo da Uréia.....	30
Figura 6: Destinos Metabólicos da Arginina.....	33
Figura 7: A Estrutura Dimérica da Na^+, K^+ -ATPase.....	37
Figura 8: Aparato de Esquiva Inibitória.....	44
Figura 9: Vista Superior do Aparato de Esquiva Inibitória.....	45
Figura 10: Aparato de Campo Aberto.....	47

Lista de Tabelas

Tabela 1: Comparação Entre Arginases AI e AII.....	21
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Ciclo da Uréia.....	12
1.2. Erros Inatos do Metabolismo.....	15
1.2.1. Histórico.....	15
1.2.2. Erros Inatos do Metabolismo dos Aminoácidos.....	15
1.2.3. Erros Inatos do Ciclo da Uréia.....	16
1.3. Arginases Humanas.....	19
1.4. Hiperargininemia.....	22
1.4.1. Achados Laboratoriais.....	24
1.4.2. Diagnóstico Laboratorial.....	25
1.4.3. Tratamento.....	27
1.5. Óxido Nítrico.....	29
1.6. Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	34
1.6.1. Histórico.....	34
1.6.2. Conceito, Função e Estrutura.....	35
1.6.3. A Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase e o Sistema Nervoso Central.....	39
1.7. Memória.....	41
1.7.1. Tipos de Memória.....	42
1.7.2. Testes de Aprendizado e Memória.....	44
1.7.3. Memória e LTP.....	48
1.8. Hiperargininemia, Na ⁺ ,K ⁺ ATPase e Memória.....	49
1.9. OBJETIVOS.....	51
2.A ADMINISTRAÇÃO DE ARGININA INIBE A ATIVIDADE DA Na⁺,K⁺-ATPase EM HIPOCAMPO DE RATOS E PREJUDICA A RETENÇÃO DA MEMÓRIA NA TAREFA DE ESQUIVA INIBITÓRIA.....	52
3. DISCUSSÃO.....	53
4. CONCLUSÕES.....	63
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
6. ANEXOS.....	85

1. Introdução

1.1. Ciclo da Uréia

O metabolismo dos aminoácidos é complexo se compararmos ao metabolismo dos carboidratos e dos lipídios (MARKS et al, 1996). Os aminoácidos que excedem as necessidades de síntese de proteínas e de outras biomoléculas não podem ser armazenados, ao contrário dos ácidos graxos e glicose, nem são excretados. Para que os aminoácidos possam ser utilizados como alimento energético no metabolismo, o grupamento amina ($-NH_3^+$) deve ser removido e os esqueletos de carbono resultantes são transformados em intermediários das principais vias metabólicas. Assim, a maioria do nitrogênio é convertido em uréia no fígado e os esqueletos de carbono originam acetil CoA, acetoacetil CoA, piruvato, ou algum outro intermediário do ciclo do ácido cítrico nos tecidos. Desta forma, os aminoácidos podem ser convertidos em ácidos graxos, corpos cetônicos e glicose, que servem de combustíveis ao organismo (STRYER, 1996; MARKS et al, 1996).

Todavia, devemos nos preocupar não apenas com o destino dos átomos de carbono dos aminoácidos, mas também com o destino do nitrogênio. Muitas enzimas são importantes no processo de interconversão dos aminoácidos e na remoção do nitrogênio, permitindo, assim, que os esqueletos de carbono sejam oxidados. O grupamento amina liberado dos aminoácidos origina a molécula de amônia, que é tóxica ao nosso organismo, particularmente ao sistema nervoso central, e deve ser excretada. Na maioria dos vertebrados terrestres, o excesso de amônia converte-se em uréia no ciclo da uréia, que ocorre principalmente no fígado. A uréia formada é levada, através da circulação sanguínea, para os rins onde é facilmente eliminada na urina (MARKS et al, 1996; LENINGER et al, 1993).

O ciclo da uréia consiste em uma série de cinco reações bioquímicas que apresentam dois papéis fundamentais: prevenir o acúmulo de compostos nitrogenados tóxicos; e transformar o nitrogênio não utilizado no processo de biossíntese em uréia, que serve como produto de eliminação de nitrogênio em mamíferos. O ciclo da uréia também apresenta muitas reações bioquímicas necessárias para a síntese *de novo* de arginina (BRUSILOW & HORWICH, 2001).

O nitrogênio entra no ciclo da uréia na forma de amônia e aspartato, que irão originar a uréia. A primeira etapa do ciclo ocorre no interior da mitocôndria, onde a amônia, o CO₂ e o ATP reagem pela ação da enzima carbamil fosfato sintetase I (CFS-I, EC 2.7.2.2.), formando carbamil fosfato. Esse intermediário do ciclo reage com a ornitina, que é o composto que tanto inicia como é regenerado pelo ciclo. Pela ação da ornitina transcarbamilase (OTC, EC 3.5.3.1.), forma-se a citrulina, que sai do interior da mitocôndria e dá continuidade ao ciclo no citosol. A citrulina reage com o aspartato, que oferece o segundo nitrogênio para a síntese de uréia e produz o argininossuccinato pela ação da argininossuccinato sintetase (AS, EC 6.3.4.5.). O argininossuccinato é clivado pela enzima argininossuccinato liase (AL, EC 4.3.2.1.) formando a arginina e o fumarato. O fumarato é convertido a malato e é utilizado em outras rotas metabólicas, como no ciclo do ácido cítrico ou na gliconeogênese. A arginina, que contém os nitrogênios derivados da amônia e do aspartato, é clivada pela arginase (EC 3.5.3.1.), produzindo a uréia e regenerando a ornitina (MARKS et al, 1996). As reações do ciclo da uréia descritas acima podem ser observadas em forma esquemática na Figura 1.

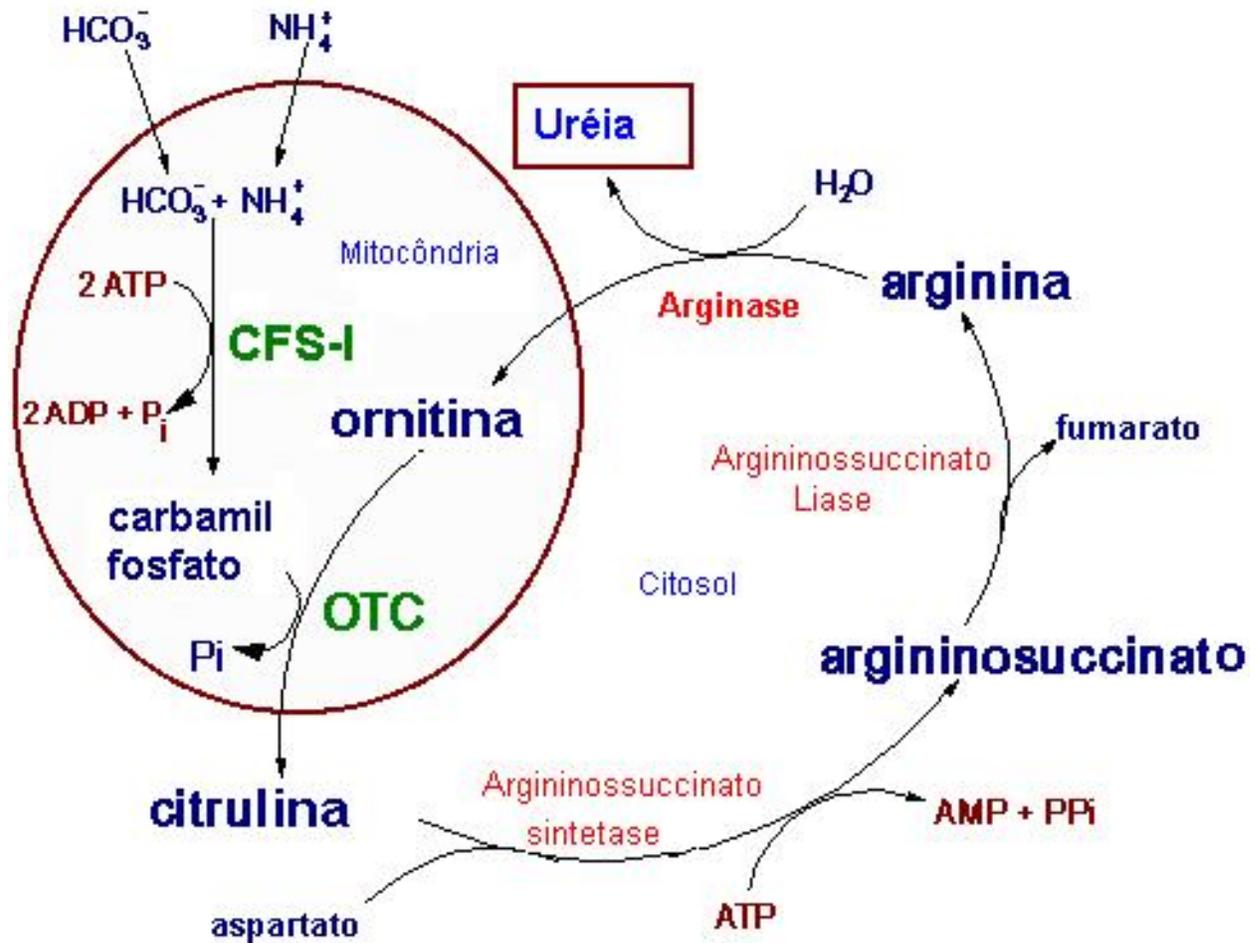


Figura 1: Representação Esquemática do Ciclo da Uréia. O ciclo da uréia ocorre parcialmente na mitocôndria e parcialmente no citosol. Cinco enzimas participam do processo: CFS-I, OTC, AS, AL e Arginase

1.2. Erros Inatos do Metabolismo

1.2.1. Histórico

A alcaptonúria é um distúrbio metabólico hereditário causado pela deficiência ou ausência da enzima homogentisato oxidase. Pacientes afetados por esta doença apresentam acúmulo tecidual e plasmático de homogentisato. A urina destes pacientes torna-se escura conforme o homogentisato é oxidado e polimerizado a uma substância semelhante à melanina. **Em 1902, Archibald Garrod** mostrou que a alcaptonúria é transmitida como um só caráter mendeliano recessivo. Além disso, reconheceu que o homogentisato é um intermediário normal na degradação da fenilalanina e da tirosina e que se acumula na alcaptonúria porque sua degradação está bloqueada. Concluiu que “o corte do anel benzênico no metabolismo normal é catalisado por uma enzima, a qual está deficiente na alcaptonúria”. Garrod percebeu a relação direta entre genes e enzimas, e reconheceu a importância da individualidade química. Seu livro imaginativo e previsor ***Inborn Errors of Metabolism*** (GARROD, 1909) abriu novos horizontes à Biologia e à Medicina (SCRIVER et al, 2001; STRYER, 1996).

1.2.2. Erros Inatos do Metabolismo dos Aminoácidos

As doenças hereditárias envolvendo o metabolismo e o transporte de aminoácidos oferecem um largo espectro de apresentações clínicas. Muitas têm um efeito substancial no sistema nervoso central. Individualmente, cada doença é relativamente rara, mas ao agregarem-se, elas formam um argumento apreciável para que o seu diagnóstico seja feito o mais breve possível. Isto é particularmente verdadeiro para doenças em que um tratamento efetivo pode prevenir o dano neuronal (NYHAN & HAAS, 1997).

A patogênese da doença clínica, na maioria dos erros inatos do metabolismo dos aminoácidos, é devido ao acúmulo de substratos e/ou seus metabólitos que é causado pela deficiência ou ausência de uma enzima. Este acúmulo, em geral, causa toxicidade. Muitos destes compostos, como fenilalanina ou leucina, são nutrientes essenciais nas quantidades normais, mas altamente tóxicos em altas concentrações. As doenças metabólicas também podem produzir um quadro patológico pela deficiência na síntese de um produto essencial ou no suprimento de energia, que parecem ser menos comuns neste grupo de doenças (NYHAN & HAAS, 1997; SCRIVER et al, 2001).

Os testes laboratoriais iniciais para este tipo de doença estão disponíveis na rotina dos laboratórios clínicos. Estes testes devem ser suplementados por algum sistema de triagem para doenças metabólicas. Devemos lembrar que os diagnósticos enzimático ou molecular são freqüentemente necessários antes do estabelecimento de um diagnóstico específico e a instituição da terapia (NYHAN & HAAS, 1997).

1.2.3. Erros Inatos do Ciclo da Uréia

As doenças conhecidas como erros inatos do ciclo da uréia eram consideradas, há algumas décadas atrás, doenças raras e que ocorriam principalmente em neonatos. Contudo, após vinte anos de pesquisas realizadas em centros de referência, verificou-se que estas doenças também podem ocorrer em idades mais avançadas e de forma mais comum do que previamente imaginava-se (BRUSILOW & HORWICH, 2001). Desta forma, a apresentação das doenças do ciclo da uréia é bastante variável: aquelas que apresentam-se no período neonatal são geralmente mais graves e quando apresentam-se mais tardiamente, na infância ou idade adulta, podem ser mais amenas (BRUSILOW & HORWICH, 1995; LEONARD, 1995).

Como resultado de um defeito enzimático no ciclo da uréia, o fluxo nesta rota metabólica é desordenado, fazendo com que a concentração dos aminoácidos que estão situados antes do defeito esteja aumentada, e a concentração daqueles que situam-se além do defeito esteja diminuída (FEILLET & LEONARD, 1998). Isso gera um acúmulo tecidual e plasmático dos aminoácidos em excesso, um aumento da concentração plasmática de glutamina e, na maioria das doenças, hiperamonemia (FEILLET & LEONARD, 1998; BRUSILOW & HORWICH, 1995).

As doenças do ciclo da uréia são caracterizadas por uma tríade de hiperamonemia, encefalopatia e alcalose respiratória (a evidência mais precoce de encefalopatia). Cinco doenças foram descritas e bem documentadas, cada qual com uma considerável variabilidade genética e fenotípica e representando um defeito na biossíntese de uma das enzimas normalmente presentes no ciclo da uréia. Quatro destas cinco doenças – deficiência de carbamil fosfato sintetase, ornitina transcarbamilase, argininossuccinato sintetase e argininossuccinato liase – apresentam manifestações clínicas praticamente idênticas e são caracterizadas por sinais e sintomas que parecem ser induzidos pelo acúmulo de amônia. A apresentação clínica mais dramática destas quatro doenças ocorre em crianças sem nenhum fator de risco obstétrico que aparentemente são normais por 24 a 48 horas e, então, apresentam letargia progressiva, hipotermia, apnéia e altos níveis plasmáticos de amônia. As formas mais amenas destas doenças podem ocorrer em qualquer idade da infância ou da vida adulta, sendo a encefalopatia um dos principais sinais característicos (BRUSILOW & HORWICH, 2001).

As manifestações clínicas relacionadas à deficiência de arginase são diferentes das demais doenças do ciclo da uréia em vários aspectos. O aumento dos níveis plasmáticos de amônia parece não ser importante na

disfunção neurológica presente nesta doença, pois costuma ser tênue (BRUSILOW & HORWICH, 2001).

Na figura 2 está demonstrado, em forma esquemática, os defeitos enzimáticos responsáveis pelos erros metabólicos do ciclo da uréia.

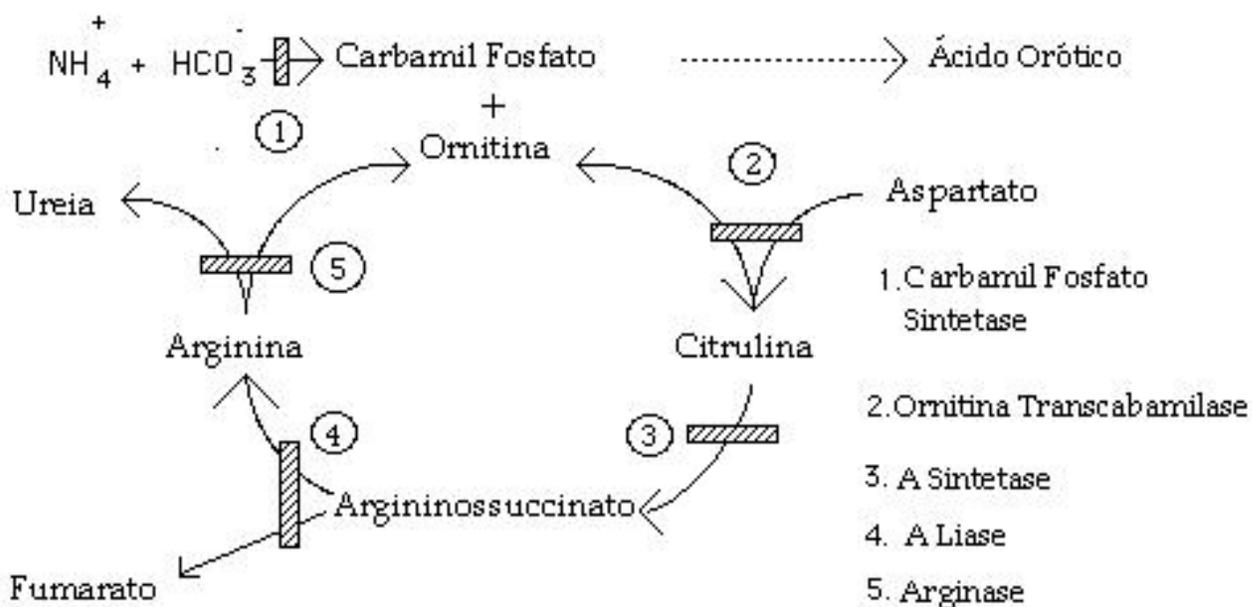


Figura 2: Erros Metabólicos do Ciclo da Uréia

1.3. Arginases Humanas

A arginase (L-arginina amidino hidrolase) é a enzima final do ciclo da uréia. Ela catalisa a hidrólise da L-arginina (Arg) formando o aminoácido não protéico L-ornitina e uréia, e está presente em altas concentrações no fígado (ASH et al, 1998). Grande parte da ureagênese ocorre no fígado, que é o único órgão que contém todas as enzimas do ciclo da uréia. Menores níveis de arginase estão presentes em outros tecido. (BRUSILOW & HORWICH 1995; JENKINSON et al, 1996). A hidrólise da arginina pode ser observada na Figura 3.

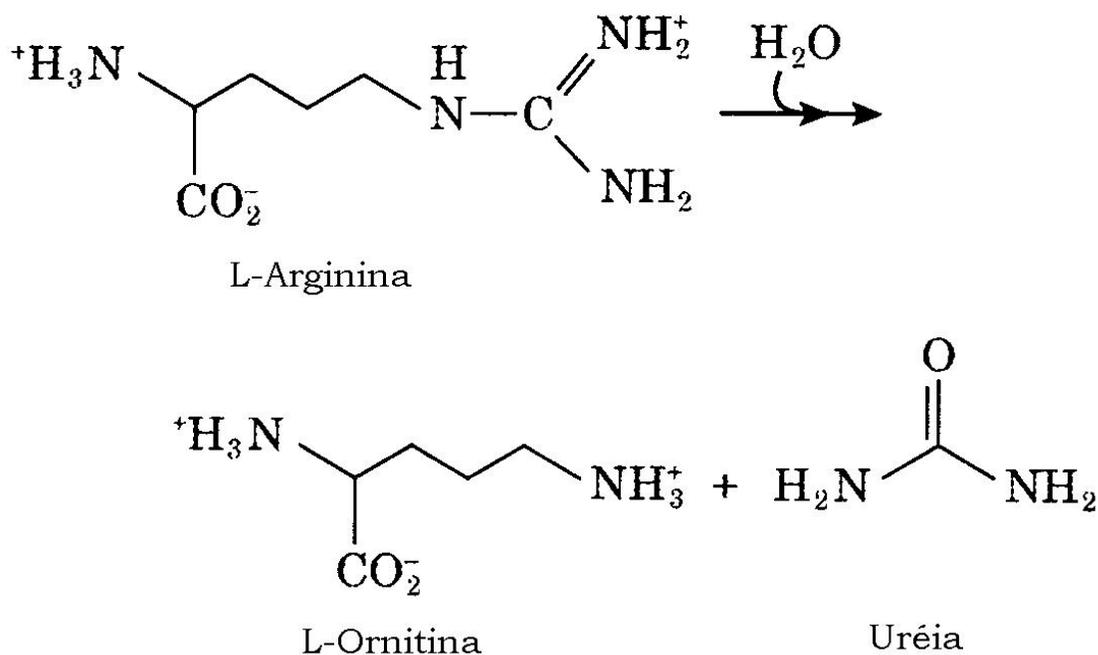


Figura 3: Hidrólise da Arginina

Adaptado de ASH et al, 1998.

A existência de mais de uma isoenzima para arginase foi proposta nos anos 70 e durante duas décadas os pesquisadores investigaram e provaram essa hipótese (GRODY et al 1989; SPECTOR et al 1983). Atualmente, embora tenha sido sugerido que existem cinco tipos distintos de arginase nos tecidos humanos (ZAMECKA & POREMBSKA, 1988), evidências genéticas demonstram a presença de somente duas isoformas: arginase I e arginase II (ASH et al, 1998).

A arginase I (AI) foi assim denominada por ter sido a primeira isoenzima encontrada no fígado, mas também está presente nos eritrócitos. Ela apresenta localização citosólica na célula, é considerada catabólica e ureogênica. A segunda forma encontrada foi denominada arginase II (AII) e está localizada na mitocôndria de rins, cérebro, trato gastrointestinal e próstata (JENKINSON et al, 1996; IYER et al, 1998). As comparações entre as propriedades das duas arginases estão listadas na tabela 1.

A arginase I é uma das mais importantes enzimas no metabolismo do nitrogênio em mamíferos, pois ela finaliza a principal rota de eliminação do excesso de nitrogênio resultante do metabolismo de aminoácidos e nucleotídeos. O fluxo de nitrogênio através desta rota é considerável, uma vez que a média de excreção individual de uréia é de aproximadamente 10 Kg por ano (ASH et al, 1998). Desta forma, sua deficiência acarreta uma série de danos ao nosso organismo. O gene da arginase AI tem 10-12kb de comprimento, possui oito éxons (TAKIGUCHI et al, 1988) e está localizado no 6q23 do genoma humano (SPARKES et al, 1986). A seqüência de aminoácidos do gene da arginase AI presente no fígado de ratos é 87% idêntica à enzima encontrada no fígado de humanos (HARAGUCHI et al, 1987), e todas as principais estruturas são conservadas na enzima do rato comparada com a de humanos. Essa homologia permite estudar e entender, em modelos experimentais com ratos, as mutações envolvidas na

deficiência de AI humana (ASH et al, 1998) e fortalecem o embasamento experimental do nosso estudo.

A descoberta da isoforma AII ocorreu em um estudo feito em 1979 com dois irmãos que apresentavam a deficiência de AI. A ingesta protéica dessas crianças foi aumentada gradativamente e as concentrações plasmáticas dos aminoácidos do ciclo da uréia e outros relacionados foram dosadas, além da excreção de uréia. O resultado obtido surpreendeu os pesquisadores, pois triplicando a ingesta protéica, dobrou a concentração de uréia na urina (CEDERBAUM et al, 1979). Esse resultado, quando combinado com estudos semelhantes realizados em animais, levou à conclusão de que havia uma segunda forma de arginase codificada por um gene diferente daquele para AI (GLASS & KNOX, 1973; KAYSEN & STRECKER, 1973). Estudos subseqüentes confirmaram essa teoria e demonstraram um aumento da expressão de AII na hiperargininemia, sugerindo que esse aumento poderia ser um mecanismo pelo qual a deficiência de AI é amenizada (SPECTOR et al, 1983; SPECTOR et al, 1994; GRODY et al, 1993; IYER et al, 1998).

Tabela 1 – Comparação Entre Arginases AI e AII

	AI	AII
Especificidade ao tecido	Fígado e eritrócitos	Rim, cérebro, Intestino e próstata
Imunoreatividade com Anti-AI	+	-
Subunidade molecular de massa (Da)	35000	40000
PI	9,3	6,8
Necessidade de [Mn ⁺²] (mmol/L)	20	2
Inibição por prolina	±	++
Inibição por isoleucina	++	±
Localização subcelular	Citosol	Mitocôndria

Adaptado de IYER et al, 1998.

1.4. Hiperargininemia

A deficiência da arginase AI é uma doença autossômica recessiva que resulta em hiperargininemia (TERHEGGEN et al, 1970; SNYDERMAN et al, 1977; CEDERBAUM et al, 1979; BERNAR et al, 1986; BRUSILOW & HORWICH, 1995). Como consequência dessa deficiência, a arginina é metabolizada por uma série de reações enzimáticas secundárias, formando uma quantidade significativa de seus metabólitos, os compostos guanidínicos (CG)(BRUSILOW & HORWICH, 2001). Com isso, pacientes afetados por essa doença apresentam aumento na concentração de arginina e de compostos guanidínicos (N- α -acetilarginina, homoarginina e ácido arginínico e ácido α -ceto- γ -guanidinovalérico) no fluido cérebro-espinhal, sangue e demais tecidos (DE DEYN et al, 1997; MARESCAU et al, 1990; MIZUTANI et al, 1987).

Os primeiros casos de hiperargininemia foram publicados em 1969 (TERHEGGEN et al, 1969) e 1970 (TERHEGGEN et al, 1970), embora um caso clínico com características similares já tivesse sido relatado por Peralta-Serrano em 1965.

Clinicamente a hiperargininemia é caracterizada por demência progressiva, espasticidade (com os membros inferiores afetados mais severamente que os membros superiores), retardo mental e psicomotor, hiperatividade, epilepsia, baixa estatura e deterioração do córtex e do trato piramidal (MARESCAU et al, 1992a; CEDERBAUM et al, 1979; SNYDERMAN et al, 1977; MICHELS & BEAUDET, 1978; BRUSILOW & HORWICH, 2001). Um sinal bastante peculiar desta doença é a espasticidade progressiva, que não é observada nas demais doenças do ciclo da uréia, sendo, portanto, característica da hiperargininemia (MARESCAU et al, 1990).

Geralmente a doença manifesta-se tardiamente, no segundo ano de vida. Todavia, há uma variabilidade fenotípica, com alguns casos aparentemente assintomáticos até os quatro anos de idade e outros que sugerem a ocorrência de manifestações clínicas no primeiro ano de vida. A maioria dos pacientes apresenta pelo menos alguns episódios de irritabilidade, choro inconsolável, vômitos, anorexia e letargia devido à hiperamonemia. Contudo, é importante salientar que a hiperamonemia não ocorre regularmente na hiperargininemia, indicando que possivelmente existam outras causas para os sintomas neurológicos desta doença (COLOMBO, 1992).

Pelo fato da hiperargininemia apresentar um quadro clínico único e, algumas vezes, mais ameno do que as demais doenças do ciclo da uréia, Marescau e seus colaboradores (1990) propuseram a hipótese de que a arginina, ao invés da amônia, seria neurotóxica nestas condições. Isso levou diversos pesquisadores a investigarem o papel da arginina e de seus metabólitos, os compostos guanidínicos, na patogênese desta doença (MARESCAU et al, 1990; MARESCAU et al, 1992a; DE DEYN et al, 1997).

Desta forma, sugeriu-se que o aumento dos níveis plasmáticos de arginina e de seus metabólitos, os CG, poderiam ser, pelo menos em parte, responsáveis pela neurotoxicidade presente na hiperargininemia (MARESCAU et al, 1992b). O caráter epileptogênico de muitos compostos guanidínicos, como homoarginina (YOKOI et al, 1984), ácido guanidinobutírico e ácido α -ceto- γ -guanidinovalérico (SHINDO et al, 1984) foi demonstrado experimentalmente em animais (MORI, 1987).

Também sugeriu-se que o excesso de arginina presente na hiperargininemia poderia servir de substrato para a síntese de óxido nítrico (NO), e o excesso de produção deste poderia ter um papel na fisiopatologia desta doença (MORI et al, 1998). Entretanto, o(s)

mecanismo(s) pelo(s) qual(is) estes compostos atuariam no sistema nervoso central e o quão responsáveis eles seriam pelo dano neurológico presente na hiperargininemia ainda permanece desconhecido.

1.4.1. Achados Laboratoriais

Os achados laboratoriais mais proeminentes incluem hiperamonemia branda, hiperargininemia ($1500\mu\text{M}$), hiperaminoacidúria (arginina, lisina, cistina, ornitina) e acidúria orótica. Os níveis plasmáticos de glutamina podem estar aumentados (BRUSILOW & HORWICH, 2001).

O aumento da concentração de outros aminoácidos, como ornitina, aspartato, treonina, glicina e metionina no fluido cérebro-espinhal é um fato inesperado. Nenhuma hipótese conseguiu explicar as altas concentrações desses aminoácidos no fluido cérebro-espinhal (BRUSILOW & HORWICH, 2001). Segundo Cederbaum e colaboradores (1979), nenhum padrão característico de sistema de transporte compartilhado ocorre aparentemente no cérebro.

Em adição à acidúria orótica citada acima, outras pirimidinas são excretadas na urina em quantidades muito maiores do que o normal (ex. uracil e uridina) (NAYLOR & CEDERBAUM, 1981). O mecanismo pelo qual ocorre a pirimidinúria permanece incerto (BRUSILOW & HORWICH, 2001).

Grandes quantidades de compostos guanidínicos monossubstituídos são encontradas na urina de pacientes com deficiência de arginase (WIECHERT et al, 1976; MARESCAU et al, 1979; MARESCAU & LOWENTHAL, 1981), sendo que a maioria destes não é resultante da doação do grupamento amidino pela arginina, mas são preferencialmente derivados da própria arginina: ácido ceto-guanidinovalérico (o ceto é análogo da arginina), N-acetilarginina e ácido arginínico. Dos grupos

guanidínicos monossubstituídos encontrados na urina que são resultantes de uma doação do grupamento amidino pela arginina, o ácido guanidinoacético (que é o produto normal da reação arginina e glicina via glicina transamidinase) é excretado em grandes quantidades, seguido pelo ácido guanidinobutírico (BRUSILOW & HORWICH, 2001). Como citado anteriormente, os compostos guanidínicos também estão em níveis aumentados no plasma e no fluido cérebro-espinhal.

1.4.2. Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial da hiperargininemia pode ser realizado através da dosagem dos altos níveis de arginina nos fluídos biológicos dos pacientes (CEDERBAUM et al, 1977).

Estudos mais recentes, que exploram novas técnicas para o diagnóstico laboratorial da hiperargininemia, sugerem a dosagem não somente da arginina, mas também de alguns compostos guanidínicos - como a homoarginina, o ácido α -ceto- δ -guanidinovalérico, o ácido arginínico e a N- α -acetilarginina - os quais estão aumentados no soro dos pacientes portadores da doença. Muitos destes metabólitos chegam a atingir concentrações plasmáticas 10 vezes maiores que o normal. Assim, a análise destes compostos poderá vir a ser utilizada como um parâmetro complementar no diagnóstico da hiperargininemia (MARESCAU et al, 1990; MARESCAU et al, 1992b).

A determinação da concentração de arginina apenas na urina pode levar a um diagnóstico falso-negativo, pois muitos pacientes hiperargininêmicos não tratados apresentam a excreção urinária de arginina dentro dos parâmetros normais, mesmo apresentando níveis séricos elevados. Isso ocorre porque pacientes com hiperargininemia geralmente seguem espontaneamente uma dieta de restrição protéica. Esse

comportamento também foi observado em pacientes que apresentam outras doenças do ciclo da uréia (MARESCAU et al, 1990).

Atualmente, o diagnóstico bioquímico da hiperargininemia é realizado quando observa-se um aumento considerável dos níveis séricos de arginina; e a confirmação deste diagnóstico é realizado pela determinação da atividade da arginase em eritrócitos (MARESCAU et al, 1990). Segundo Spector e colaboradores (1980), as células vermelhas fetais e adultas apresentam arginases com propriedades idênticas. Assim, células vermelhas fetais obtidas por amnioscentese ou amnioscopia podem ser úteis no diagnóstico pré-natal da doença (CERONE et al, 1997).

Novos métodos que utilizam a haplotipagem cromossômica são sugeridos na literatura para o diagnóstico pré-natal, apesar de ainda não terem sido amplamente explorados para a hiperargininemia (IYER et al, 1998). A haplotipagem é uma técnica de sequenciamento do DNA correlacionada com os genes do MHC (Major Histocompatibility Complex – Complexo de Histocompatibilidade Principal), que codificam proteínas que são essenciais para o reconhecimento imune e, em humanos, incluem as moléculas do HLA (Human Leukocyte Antigen – Antígeno Leucocitário Humano). Essa técnica é utilizada em estudos familiares e baseia-se na análise dos haplotipos do MHC dos indivíduos. Esses haplotipos são considerados como unidades genéticas fixas, sendo possível reconhecer haplotipos idênticos no intervalo entre HLA-B a HLA-DR do genoma. Se um haplotipo carrega um gene suscetível a uma determinada doença, aparentemente todos os exemplos independentes daquele haplotipo irão demonstrar associação com aquela doença. Por outro lado, se o haplotipo não apresenta o gene suscetível a uma determinada doença, então seus alelos constituintes serão protetores. Essa técnica poderá servir como um marcador étnico da distribuição de doenças genéticas (DELGADO & YUNIS, 2001).

1.4.3. Tratamento

O tratamento da hiperargininemia parece ser o mais ameno quando comparado ao de outras doenças do ciclo da uréia, já que esta doença não apresenta-se normalmente de forma aguda, mas sim de forma crônica e progressiva. A hiperamonemia não é freqüente e, em geral, é facilmente tratável nos indivíduos portadores desta doença. Contudo, em algumas circunstâncias nas quais há um aumento significativo de amônia plasmática, faz-se necessário diminuir os altos níveis desta substância (IYER et al, 1998).

Os primeiros trabalhos publicados, que descreviam apenas o uso de terapia dietética em pacientes com deficiência de AI, sugeriam que uma aplicação rigorosa deste tratamento (que na maioria das vezes tornava-se socialmente inaceitável) poderia reduzir os níveis plasmáticos de arginina para normais ou próximos ao normal, além de diminuir os níveis anormais de aminoácidos no fluido cérebro-espinhal (CEDERBAUM et al, 1982; DE DEYN et al, 1997; SNYDERMAN et al, 1979). A terapia dietética teve um impacto gradual na doença neurológica e recuperou uma série de funções que haviam sido perdidas em vários casos, incluindo a recuperação da fala e controle das funções fisiológicas (IYER et al, 1998).

Por outro lado, outros estudos demonstraram que somente o uso de restrição protéica não é suficiente para normalizar a hiperargininemia (MARESCAU et al, 1990; IYER et al, 1998). Uma combinação da terapia de restrição protéica juntamente com um suplemento de aminoácidos essenciais com ou sem a administração de benzoato de sódio parece ser eficaz em diminuir os níveis de arginina nos fluidos biológicos (MARESCAU et al, 1990).

O uso do benzoato de sódio, bem como do ácido fenilacético, foi sugerido visando a estimulação de rotas alternativas para a excreção de amônia. Foi demonstrado que o uso destes medicamentos promove um aumento da excreção de metabólitos nitrogenados não uréicos em pacientes com erros inatos do ciclo da uréia. A administração oral de benzoato de sódio e ácido fenilacético reduzem a amônia plasmática porque aumentam a excreção de ácido hipúrico e fenilacetilglutamina, respectivamente (BATSHAW et al, 1981; MIZUTANI et al, 1983; FEILLET & LEONARD, 1998).

Contudo, não existe ainda nenhum tratamento considerado definitivo para a hiperargininemia. Todas as medidas terapêuticas conhecidas até o momento visam reduzir os níveis de arginina, de seus metabólitos e de outros aminoácidos nos fluidos biológicos dos pacientes hiperargininêmicos e, assim, diminuir o risco da disfunção neurológica característica desta doença.

1.5. Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é sintetizado endogenamente pela ação da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) em tecidos especializados tendo como precursora a L-arginina. A síntese do NO pode ser observada na Figura 4.

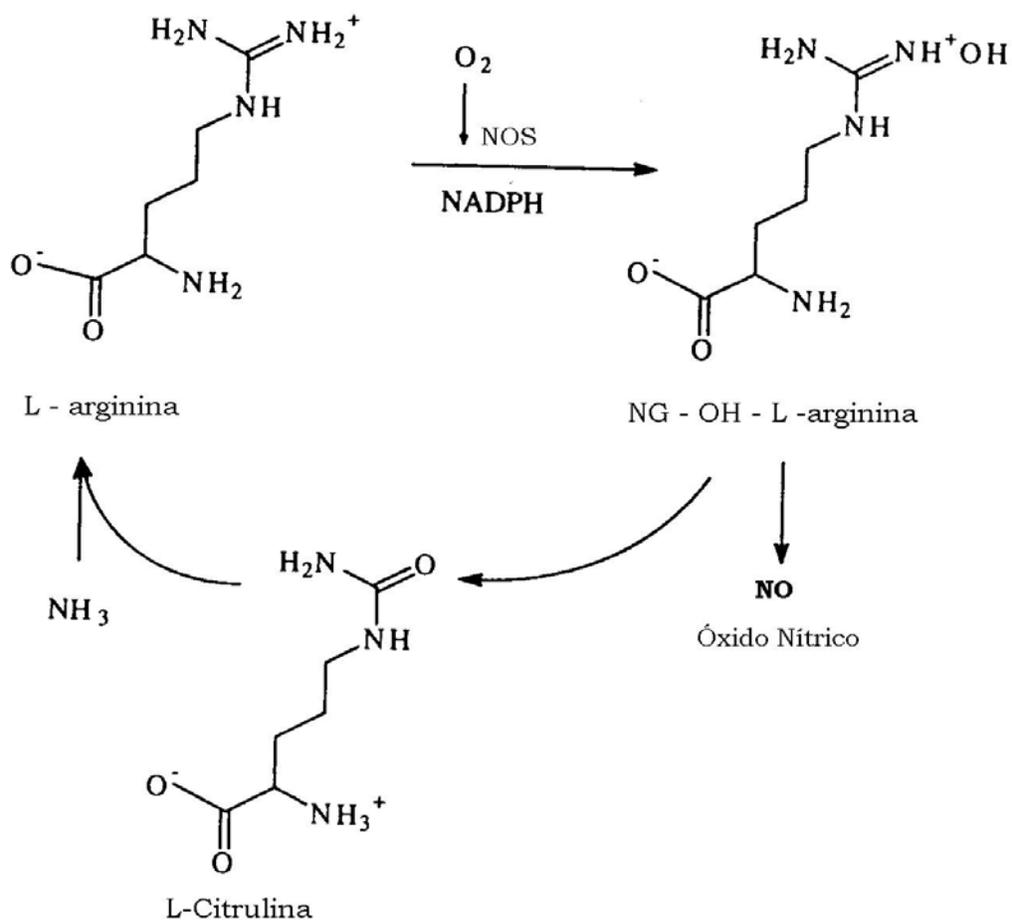


Figura 4: Síntese do Óxido Nítrico

Adaptado de SHINDE et al, 2000.

A síntese de NO à partir da arginina gera como co-produto a citrulina, que pode ser reciclada a arginina pela ação das enzimas argininossuccinato sintase (AS) e argininossuccinato liase (AL) (MORI et al, 1998). Estas reações formam o ciclo que é chamado “ciclo citrulina - óxido nítrico” (NUSSLER et al, 1994) ou “ciclo arginina-citrulina” (HATTORI et al, 1994) e está representado na figura 5.

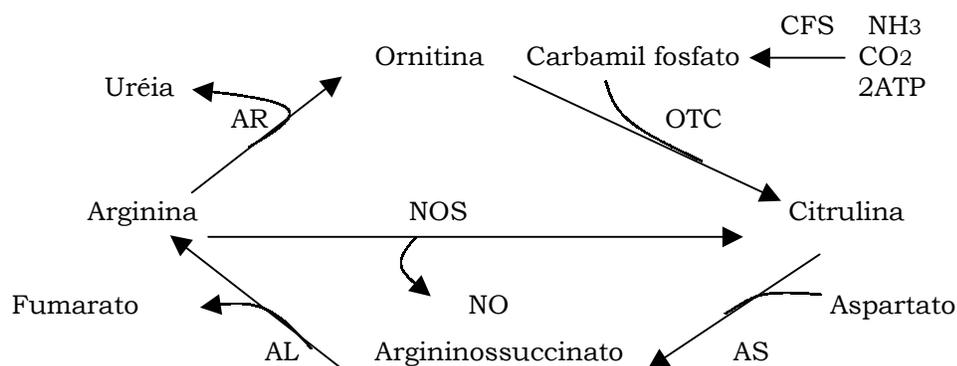


Figura 5: O Ciclo Citrulina-Óxido Nítrico e o Ciclo da Uréia. O ciclo citrulina- óxido nítrico é composto por NOS, argininossuccinato sintase (AS) e argininossuccinato liase (AL). O ciclo da uréia é composto por carbamil fosfato sintase I (CFS), ornitina transcarbamilase (OTC), argininossuccinato sintase (AS), argininossuccinato liase (AL) e arginase (AR).

Adaptado de MORI et al, 1998.

O NO está envolvido em diversos processos fisiológicos como vasodilatação, memória, neuroproteção, peristaltismo, defesa imune, secreções endócrinas e exócrinas e em vários sistemas como o sistema nervoso central, cardiovascular, reprodutivo e imunológico. Pequenas

quantidades de NO produzidos por enzimas constitutivas regulam estes efeitos fisiológicos (SHINDE et al, 2000). Por outro lado, o NO é um radical livre que tem uma meia-vida curta devido a sua alta reatividade com outros constituintes intracelulares, como os superóxidos. A reação entre o NO e o superóxido resulta na formação do ânion peróxinitrito (ONOO^-), que é extremamente citotóxico (BECKMAM et al, 1993). Desta forma, o NO também participa de certas condições patológicas (BREDT, 1999).

No sistema nervoso central (SNC), o NO também é sintetizado pela ação da NOS à partir da arginina. Existem no mínimo três isoformas da NOS neste tecido, sendo que nos neurônios o NO é geralmente sintetizado via ativação da isoforma neuronal da NOS constitutiva dependente de cálcio (nNOS), enquanto que em astrócitos e outras células gliais, a produção de NO ocorre via uma indução cálcio-independente (síntese enzimática *de novo*) da NOS (iNOS). A terceira isoforma, eNOS, já foi descrita no SNC, e parece estar situada principalmente no sistema vascular cerebral (LINCOLN et al, 1997).

Os principais papéis fisiológicos do NO no SNC incluem percepção da dor, plasticidade sináptica, Potenciação de longa duração (Long-Term Potentiation - LTP) e aprendizado (LINCOLN et al, 1997; SOUTHAM et al, 1991). Contudo, apesar da importância fisiológica atribuída ao NO, sua produção excessiva parece estar relacionada à patogênese de muitas doenças neurológicas (DAWSON & DAWSON, 1996; HEALES et al, 1999).

Vários mecanismos parecem estar envolvidos na neurotoxicidade mediada por NO/ ONOO^- . Neste contexto, foi demonstrado que estas moléculas interagem com os complexos da cadeia respiratória mitocondrial inibindo a respiração celular e conseqüentemente causando um déficit de energia (BRUNELLI et al, 1997; HEALES et al, 1999; SARTI et al, 1999). Além disso, o NO parece estar envolvido na neurotoxicidade mediada pelos

receptores NMDA do glutamato (DAWSON et al, 1991). Evidências também mostraram que o ONOO^- é um potente oxidante que reage rapidamente com grupamentos sulfidríla, podendo oxidar lipídios (RADI et al, 1991), proteínas (MORENO & PRYOR, 1995) e DNA (RADI et al, 1991).

A produção celular de óxido nítrico é totalmente dependente da arginina disponível (MORI et al, 1998). Considerando que na hiperargininemia ocorre um acúmulo de arginina (BRUSILOW & HORWICH, 2001), evidências sugerem que o NO possa ter um papel importante na patogênese desta doença (MORI et al, 1998). Os diversos destinos metabólicos da arginina e sua correlação com a síntese de óxido nítrico são demonstrados, em forma de esquema, na Figura 6.

A inibição do NOS é um processo neuroprotetor em muitos modelos de isquemia cerebral e em outras circunstâncias neurotóxicas (DAWSON & SNIDER, 1994). O L-NAME (N^{m} -nitro-L-arginine methyl ester), que é um potente inibidor da NOS, é capaz de prevenir a acidose intracelular no cérebro durante isquemia cerebral em coelhos (REGLI et al, 1994). A administração de L-NAME também protege os neurônios hipocampais da região CA1 da toxicidade induzida pela injeção local de NMDA em ratos (MONCADA et al, 1992) e reduz o tamanho do infarto após isquemia cerebral focal em camundongos (CARREAU et al, 1994). Além disso, o L-NAME também previne o efeito inibitório do glutamato sobre a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase em cérebro de ratos (AVROVA et al, 1999).

1.6. Na^+, K^+ -ATPase (ATP fosfohidrolase, EC 3.6.1.3)

1.6.1. Histórico

A idéia da presença de uma bomba de sódio na membrana celular foi introduzida por Dean em 1941, no artigo intitulado “Teorias do equilíbrio eletrolítico no músculo”. Este trabalho refere-se aos experimentos realizados por outros pesquisadores (HEPPEL, 1938; HEPPEL & SCHMIDT, 1939 e STEINBACH, 1940; segundo DEAN, 1941) que possibilitaram que Dean concluísse “que o músculo pode mover ativamente sódio e potássio contra um gradiente de concentração. Por essa razão, deve existir algum tipo de bomba, possivelmente localizada na membrana, que tivesse a capacidade de liberar o sódio para fora da célula e permitir a entrada de o potássio para o interior da mesma” (DEAN, 1941).

Em 1954, quando Skou começou a trabalhar com ATPase de membrana do nervo, já havia informação suficiente para que se aceitasse que o sistema de transporte deveria ocorrer através de um sistema enzimático ligado à membrana. Assim, em 1957 Jens C. Skou finalmente demonstrou a existência deste sistema de forma experimental e definiu pela primeira vez a Na^+, K^+ -ATPase em uma publicação de extremo impacto para a ciência, que é citada, devido a sua grande importância, até os dias de hoje (SKOU, 1957; SKOU, 1989).

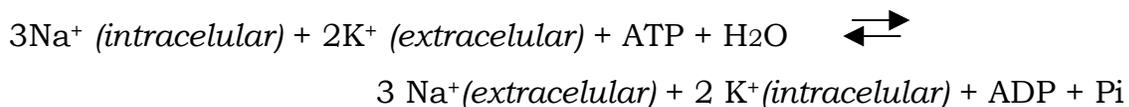
A descoberta da enzima Na^+, K^+ -ATPase foi amplamente reconhecida pela comunidade científica em 1997 quando o **Prêmio Nobel de Química** foi entregue a **Jens C. Skou** por sua brilhante descoberta realizada em 1957.

1.6.2. Conceito, Função e Estrutura

Desde o seu descobrimento em 1957, há aproximadamente 45 anos atrás, o primeiro sistema de transporte enzimático descoberto na natureza - bomba de Na⁺ e K⁺, ou Na⁺,K⁺-ATPase - continua a cativar biólogos de diferentes áreas, devido ao seu importante papel eletrofisiológico no transporte ativo de substâncias nos sistemas biológicos (BERTORELLO & KATZ, 1995).

A Na⁺,K⁺-ATPase transloca Na⁺ e K⁺, contra seus gradientes de concentração, através da membrana plasmática utilizando a energia proveniente da hidrólise do ATP intracelular em ADP como força motriz. Este gradiente eletroquímico gerado pela liberação de Na⁺ e pela entrada de K⁺ para o interior da célula é essencial para a atividade elétrica nos tecidos excitáveis além de auxiliar no movimento de outros íons e nutrientes através da membrana como uma atividade secundária (BERTORELLO & KATZ, 1995).

A estequiometria geral da reação pode ser representada segundo a equação que segue:



Três cargas positivas são transportadas para o meio extracelular enquanto apenas duas são transportadas para o meio interno. Dessa forma, o trabalho realizado caracteriza-se como um antiporte eletrogênico, ou seja, o fluxo dos íons Na⁺ e K⁺ produz um gradiente eletroquímico através da membrana celular (LINGREL & KUNTZWEILER, 1994).

Este gradiente é usado como fonte de energia para a formação, despolarização e repolarização do potencial de membrana, para a manutenção e regulação do volume celular, transporte ativo Na^+ -dependente de glicose, aminoácidos, neurotransmissores e para cotransporte/antiporte de outros íons (GEERING, 1990).

A regulação da Na^+, K^+ -ATPase pode ser dividida em regulação de “longa duração”, principalmente envolvendo mudanças na taxa de síntese ou degradação da mesma, e na regulação de “curta duração”, responsável pela alteração rápida da atividade da enzima, que ocorre, por exemplo, em minutos. Tradicionalmente, o último tipo de regulação foi identificado como sendo secundário às mudanças intracelulares de Na^+ , que é um parâmetro limitante para as bombas de células intactas. Novas evidências, complementares a flutuação das concentrações intracelulares de Na^+ , demonstram que alterações agudas na ativação da Na^+, K^+ -ATPase são mediadas por redes complexas, as quais são mediadas por receptores que, por sua vez, são mediados por sinais de transdução em resposta a um estímulo extracelular. Este mecanismo de sinalização compartilha reações comuns de fosforilação e tem como ponto fundamental a ativação ou inibição de proteínas quinases e fosfatases (BERTORELLO & KATZ, 1995).

Quanto a sua estrutura, a Na^+, K^+ -ATPase é um complexo formado por dois polipeptídeos, uma subunidade α e uma subunidade β , além de um número de moléculas de lipídeos incorporadas no interior da bicamada lipídica da membrana plasmática (SKOU & ESMANN, 1992). A representação esquemática da estrutura da Na^+, K^+ -ATPase está demonstrada na Figura 7.

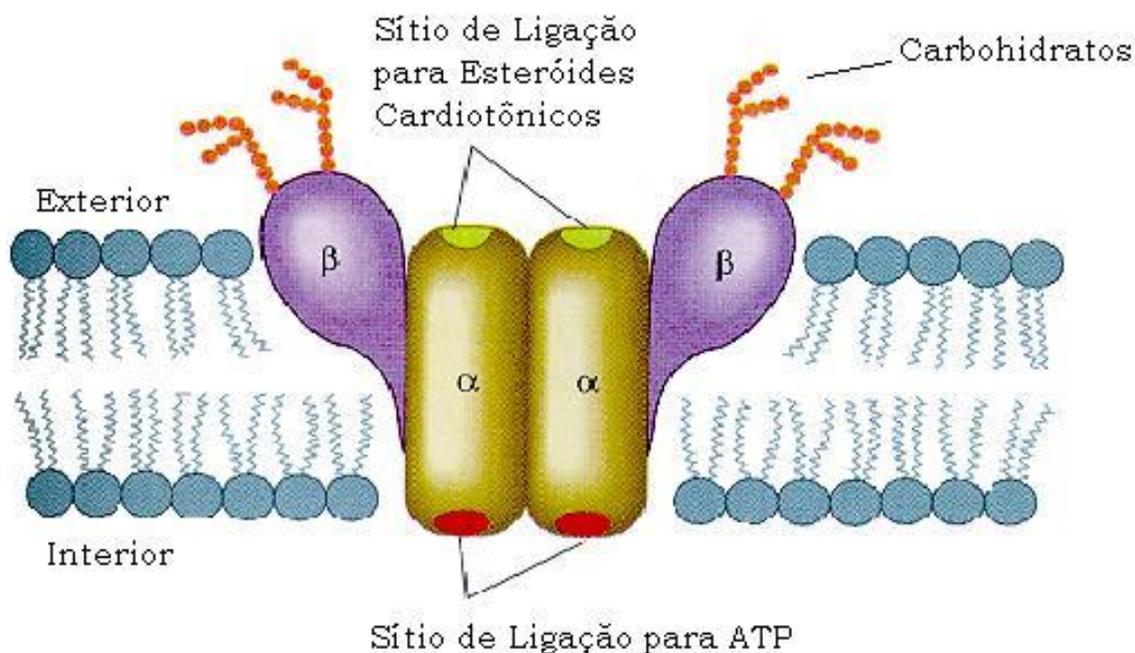


Figura 7: A Estrutura Dimérica da Na^+, K^+ -ATPase Indicando sua Orientação na Membrana Plasmática.

Adaptado de VOET & VOET, 1995.

A subunidade α contém aproximadamente 1012 aminoácidos, apresenta um peso molecular de 112 kD e está associada à propriedade catalítica da enzima (SKOU & ESMANN, 1992). A subunidade α foi primeiramente determinada no cDNA de rim de ovelhas (SHULL et al, 1985). Estudos posteriores demonstraram que as seqüências das subunidades α de diferentes espécies e tecidos são praticamente idênticas entre si (SKOU & ESMANN, 1992).

Foram encontradas três isoformas da subunidade α : a isoforma $\alpha 1$ está presente em praticamente todas as células, $\alpha 2$ é predominante nos músculos esqueléticos e a $\alpha 3$ no tecido nervoso (LINGREL &

KUNTZWEILER, 1994; HABIBA et al, 2000). Estas três isoformas apresentam o mesmo peso molecular, porém apresentam diferenças na composição da sua seqüência de aminoácidos (LINGREL & KUNTZWEILER, 1994). A homologia entre as três isoformas no cérebro é de aproximadamente 90%. Mais recentemente, foi caracterizada uma quarta isoforma da subunidade α (α_4), a qual parece ser encontrada somente em espermatozoides (WOO et al, 1999; WOO et al., 2000).

A subunidade α apresenta um sítio para fosforilação (ASP 369) no lado citoplasmático. A junção extracelular entre o primeiro e o segundo segmento transmembrana da subunidade α é importante na sensibilidade a glicosídeos cardíacos (SKOU & ESMANN, 1992). Os glicosídeos cardíacos, como a ouabaína, inibem a atividade da Na^+, K^+ -ATPase por ligarem-se à subunidade catalítica pelo lado extracelular através de um complexo mecanismo que é modificado pela presença de nucleotídeos (ATP) e muitos ligantes incluindo Na^+ , K^+ , Mg^{2+} e Pi (HANSEN, 1984). Embora a fosforilação não seja um pré-requisito para a ligação de ouabaína, um intermediário fosforilado, provavelmente E2P, parece ter a maior afinidade por ouabaína (STAHL, 1984). Quando a ouabaína, que é um inibidor específico da Na^+, K^+ -ATPase, liga-se a subunidade α fosforilada impede a etapa de desfosforilação (SKOU & ESMANN, 1992).

A subunidade β contém em torno de 300 aminoácidos e apresenta peso molecular de 60 kD (SKOU & ESMANN, 1992). Ela foi primeiramente determinada em 1986 à partir do cDNA do rim de ovelhas (SHULL et al, 1986). Estudos realizados em diferentes tecidos demonstraram que a subunidade β apresenta duas isoformas (β_1 e β_2) com baixa homologia entre si. A isoforma β_1 é predominante nos rins de mamíferos e β_2 foi isolada principalmente no cérebro (SWEADNER, 1991; CANFIELD et al, 1991). Um recente estudo demonstrou a presença de uma terceira

isoforma da subunidade β ($\beta 3$) em neurônios imaturos e diferenciados (HABIBA et al, 2000).

A subunidade β parece ter importância na inserção do complexo $\alpha\beta$ na membrana. Não é possível separar a subunidade β da subunidade α sem que haja perda da atividade da $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$. Também foi demonstrado que a redução das ligações dissulfeto na subunidade β leva a uma inativação da atividade enzimática. Essas observações sugerem um papel estrutural para esta subunidade. Além disso, a isoforma $\beta 2$ parece também desempenhar um papel importante na interação célula-célula (SKOU & ESMANN, 1992; SWEADNER, 1991).

1.6.3. A $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ e o Sistema Nervoso Central

As principais funções que caracterizam o sistema nervoso central são a geração, o processamento e a transmissão de impulsos. Essas atividades só podem ser realizadas se os íons chave, Na^+ , K^+ e Ca^{2+} são mantidos em um desequilíbrio eletroquímico através da membrana plasmática neuronal, o que requer um constante aporte de energia. Por essa razão, 50-60% do ATP total produzido no cérebro é usado para possibilitar o movimento de íons (ERICINSKA & SILVER, 1994).

A $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ apresenta um importante papel na homeostase iônica e hiperpolariza neurônios devido ao transporte de Na^+ e K^+ dependente de ATP (GLYNN & KARLISH, 1975; THOMAS, 1972). Esta enzima apresenta um papel crucial no sistema nervoso central, sendo responsável pelo transporte ativo de íons necessário para manter o gradiente iônico e a excitabilidade neural (SILVA et al, 1999). Ela está presente em altas concentrações não somente nos neurônios, como também nas células gliais (BOLDYREV, 1985; PEVZNER, 1972), incluindo

os astrócitos, como recentemente demonstrado por Magistretti e Pellerin (2000). Esta enzima consome aproximadamente 40-50% do ATP formado no cérebro. Além disso, a Na^+, K^+ -ATPase parece ser, em grande parte, responsável pelas mudanças na fluidez da membrana (ERICINSKA & SILVER, 1994; WHELLER et al, 1975).

Alterações no mecanismo que mantém o equilíbrio entre a taxa de íons sódio e íons potássio intra e extra-neuronal podem ter conseqüências graves para a célula (ERICINSKA & SILVER, 1994). A inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase tem sido associada a diversas neuropatologias, tais como doença de Alzheimer (PALMER et al, 1987; TSAKIRIS et al, 2000), epilepsia (MENINI et al, 1984; PERLMAN & GOLDSTEIN, 1984; GRISAR, 1984) e isquemia cerebral (WYSE et al, 2000).

Outro ponto importante a ser citado, é que a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase por ouabaína induz a liberação de neurotransmissores incluindo o glutamato, que desempenha um importante papel na morte neuronal (CHOI & ROTHMAN, 1990; WESTERINK et al, 1989). Além disso o glutamato inibe a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em sinaptossomas de cérebro de ratos (AVROVA et al, 1999).

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* realizados na última década demonstraram que alguns aminoácidos inibem a atividade da Na^+, K^+ -ATPase (WYSE, 1995; WYSE et al, 1995a-b; WYSE et al, 1999; WYSE et al, 2001; BÜGUER, 1998; SILVA, 1999; SILVA et al, 1999; PONTES et al, 2000; STRECK et al, 2001). Wyse e colaboradores (1995a) demonstraram que a fenilalanina e seus metabólitos (fenilpiruvato, fenilacetato e fenilactato) inibem a atividade da Na^+, K^+ -ATPase *in vitro*; e semelhante resultado foi demonstrado por Bürguer (1998) para leucina, valina, isoleucina e seus cetoácidos, os quais estão acumulados na doença do xarope do bordo. Wyse e colaboradores (1995b e 1999) também

demonstraram que a hiperfenilalaninemia experimental crônica reduz a atividade da Na^+, K^+ -ATPase. A administração de prolina diminuiu a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral de ratos *in vivo* e *in vitro* (PONTES et al, 2000) e a homocisteína também diminuiu a atividade da enzima em hipocampo de ratos *in vitro* (STRECK et al, 2001).

Além disso, um estudo realizado por Silva e colaboradores (1999) demonstrou que, com exceção da arginina, os compostos guanidínicos (N-acetilarginina, ácido arginínico e homoarginina) em concentrações semelhantes às aquelas encontradas no plasma e no líquido dos pacientes com hiperargininemia, inibem significativamente a atividade da Na^+, K^+ -ATPase *in vitro*.

1.7. Memória

O aprendizado e a memória são propriedades básicas do SNC. Com elas, desenvolvemos estratégias mais adequadas de acordo com experiências passadas. São processos interligados e inexistem sem experiências (MELLO e SOUZA, 2001).

A memória pode ser definida de várias maneiras, mas neste trabalho ela é abordada, basicamente, como o armazenamento e a evocação de uma informação aprendida (IZQUIERDO, 1992). As redes neurais do cérebro são capazes de responder às novas experiências através de padrões específicos de ativação (PARIS, 2001). Desta forma, estas redes, que são ativadas em uma determinada situação por um padrão particular de estimulação, tendem a ser novamente ativadas quando um padrão de estimulação similar for aplicado novamente no futuro – esta é a essência da memória (SIEGEL, 2000).

A formação da memória é um processo dinâmico que pode ser dividido basicamente em três fases: (1) aquisição da informação através da experiência; (2) consolidação, momento ainda instável que é processado para seu (3) armazenamento (MCGAUGH, 1966 e 2000; IZQUIERDO, 1989; QUILLFELDT, 1994). A abordagem fenomenológica nos permite estudar este processo, bem como avaliá-lo, através da evocação da memória (MELLO e SOUZA, 2001; QUILLFELDT, 1994). Assim, a memória pode gerar uma mudança de comportamento e é geralmente avaliada por esta mudança, que ocorre devido ao processo de memorização (PARIS, 2001; MELLO e SOUZA, 2001).

1.7.1. Tipos de Memória

As memórias podem ser classificadas de acordo com o seu conteúdo (declarativas ou explícitas, de procedimento ou implícitas) (SQUIRE, 1992), de acordo com a sua duração (memórias de curta duração -*Short-Term Memory* [STM] - e memórias de longa duração - *Long-Term Memory* [LTM]) (CHERKIN, 1968; GOLD & McGAUGH, 1975, McGAUGH, 1966; McGAUGH, 1968; IZQUIERDO et al, 1999a) e de acordo com sua natureza: de arquivo (STM e LTM) ou transitórias, de momento a momento (memória de trabalho - *Working Memory* [WM])(GOLD & McGAUGH, 1975; GOLDMAN-RAKIC, 1992; IZQUIERDO et al, 1999a). Neste trabalho, levaremos em consideração o conceito de McGaugh (1966), no qual determina a existência de “três sistemas de memória reconhecidos: um para memória imediata; um para memória de curta duração (que desenvolve-se em segundos ou minutos e dura por várias horas); e um que consolida-se mais lentamente e é relativamente permanente”.

A memória imediata dura segundos ou alguns minutos (GOLD & McGAUGH, 1975; JACOBSEN, 1936; MARKOWITSCH, 1997; IZQUIERDO

et al, 1999a), e atualmente é identificada como memória de trabalho (WM) (GOLD & McGAUGH, 1975; GOLDMAN-RAKIC, 1992; IZQUIERDO et al, 1999a). O termo STM designa a memória que desenvolve-se em poucos segundos ou minutos e dura por várias horas enquanto ocorre lentamente a consolidação da LTM (IZQUIERDO et al, 1998a; IZQUIERDO et al, 1998b; IZQUIERDO et al, 1998c; McGAUGH, 1966; WOLFMAN et al, 1994). O termo LTM é usado para designar memórias que duram pelo menos 24h (IZQUIERDO et al, 1998a; IZQUIERDO & MEDINA, 1995a; McGAUGH, 1966; IZQUIERDO et al, 1998d; WOLFMAN et al, 1994; IZQUIERDO et al, 1999a).

A WM e os outros tipos de memória (STM e LTM) pertencem a fenômenos de categorias completamente diferentes. A WM é dependente da atividade elétrica das células no córtex pré-frontal (FUSTER, 1998; GOLD & McGAUGH, 1975; GOLDMAN-RAKIC, 1992) ligado a outras regiões (GOLDMAN-RAKIC, 1992; SALMON et al, 1996); assim, ela persiste apenas enquanto a atividade elétrica persistir. A STM e a LTM são, ao contrário, sistemas cujo principal papel é preservar memórias para uso posterior, quando requeridas. O não armazenamento de WM além de alguns segundos ou minutos é explicado por respostas inibitórias dos neurônios encarregados da WM (GOLD & McGAUGH, 1975; GOLDMAN-RAKIC, 1992; IZQUIERDO et al, 1999a).

As memórias de longa duração (LTM) podem ser divididas em associativas e não associativas dependendo dos mecanismos requeridos para a sua formação. Memórias associativas são baseadas na aquisição de uma ligação entre um evento específico e um estímulo. Memórias não associativas são adquiridas quando exposições contínuas ou repetidas a um novo estímulo muda a resposta comportamental a este (VIANNA et al, 2000; IZQUIERDO & MEDINA, 1997a; ZHU et al, 1997; THIEL et al, 1998; EICHENBAUM, 1999; McGAUGH 2000).

Em nosso estudo, investigamos apenas a formação de LTM associativa, pois escolhemos utilizar o teste de esQUIVA inibitória (ou passiva), o qual foi realizado com intervalos de 24h entre treino e teste.

1.7.2. Testes de Aprendizado e Memória

O teste de esQUIVA inibitória envolve o aprendizado de não descer de uma plataforma para evitar um choque suave nas patas (IZQUIERDO & MEDINA, 1997a). O animal é submetido a uma sessão de treino, na qual é colocado sobre a plataforma do aparato de esQUIVA inibitória e, ao descer desta com as quatro patas, recebe um leve choque (0,3-0,4 mA); após 24h é colocado novamente na plataforma (sessão de teste) e o comportamento de permanência na plataforma nos permite avaliar o aprendizado e a memória. Geralmente ele é realizado em apenas um teste, o que faz com que ele seja ideal para avaliar processos que foram iniciados no treino (IZQUIERDO & MEDINA, 1997a). O aparato de esQUIVA inibitória é demonstrado nas Figuras 8 e 9.



Figura 8: Aparato de EsQUIVA Inibitória

Existem vários motivos pelos quais a esquivia inibitória é o teste mais amplamente utilizado para estudos de memória e considerado um paradigma do aprendizado (McGAUGH, 1966, 2000; GOLD, 1986; ROSE, 1995a,b; IZQUIERDO & MEDINA, 1997a,b). Podemos citar como exemplo a sua rápida aquisição (segundos), o que facilita a análise do tempo de ocorrência de eventos pós-treino (GOLD, 1986; IZQUIERDO & MEDINA, 1995a; IZQUIERDO et al, 1997; O`CONNELL et al, 1997); e sua farmacologia e bases moleculares, que já foram extensamente estudadas, particularmente na região CA1 do hipocampo e no córtex entorrinal (IZQUIERDO & MEDINA, 1995a; IZQUIERDO & MEDINA, 1997a).



Figura 9: Vista Superior do Aparato de Esquivia Inibitória, Demonstrando de que Forma o Animal se Posiciona na Plataforma.

O teste de esquiva inibitória representa uma forma de memória constantemente utilizada pelos humanos e necessária para a sobrevivência. Este é o tipo de aprendizado que nos lembra de evitar colocar os dedos em uma tomada de luz, atravessar uma rua sem olhar para os lados, visitar lugares perigosos, etc. (IZQUIERDO & McGAUGH, 2000). Na realidade, este teste representa um dos maiores determinantes do comportamento utilizado para a sobrevivência de todas as espécies (GOLD, 1986), e a rapidez de sua aquisição não deve subentender que ele é inato ou implícito (IZQUIERDO & MEDINA, 1997a). De fato, existem vários componentes implícitos mensuráveis nesse teste (bradicardia) que, diferentemente de seus componentes explícitos (aumento do tempo de latência), são insensíveis ao choque eletro-convulsivo (HINE & PAOLINO, 1970; IZQUIERDO & MEDINA, 1997a).

O componente declarativo do teste de esquiva inibitória envolve crucialmente o hipocampo (IZQUIERDO & MEDINA, 1997a), cuja importância para memória explícita em animais foi particularmente bem estabelecida utilizando-se testes com sugestões espaciais distantes (MORRIS et al, 1986), testes com sugestões espaciais e ou seqüenciais próximas (SQUIRE, 1992; ZOLA-MORGAN et al, 1993), e testes para memória contextual (EICHENBAUM, 1996, 1999; EICHENBAUM et al, 1996) incluindo a esquiva inibitória de um teste e suas variantes (LORENZINI et al, 1996; IZQUIERDO & MEDINA, 1997a; IZQUIERDO et al, 1999a). Estes testes envolvem o chamado medo contextual (IZQUIERDO et al, 1979, 2000a,b; VAZDARJANOVA & McGAUGH, 1999a,b).

Além disso, em estudos farmacológicos, o teste de esquiva inibitória permite avaliar, conforme o momento de administração de uma droga, seu efeito na aquisição, consolidação ou evocação da memória (McGAUGH, 1966; IZQUIERDO & McGAUGH, 2000). Neste estudo, utilizamos

diferentes momentos para a administração das soluções com o intuito de avaliarmos o efeito sobre esse três processos.

O teste de *habituação em campo aberto* foi originalmente descrito por Hall (1934) e tinha como objetivo testar os efeitos de ambientes não familiares sobre a emocionalidade em ratos. Em essência o teste consiste na mensuração dos comportamentos eliciados pela colocação do sujeito experimental em um espaço novo e aberto do qual a fuga é prevenida por uma parede circundante (NAHAS, 1999). O aparato de campo aberto é demonstrado na Figura 10.

Nesse estudo, realizamos somente a sessão de teste, após a administração das soluções, e utilizamos como parâmetros o tempo de latência para sair do primeiro quadrado (timidez), número de bolos fecais (emocionalidade), número de cruzamentos (taxa de ambulação – atividade motora) e número de *rearings* (levantar-se em duas patas - habituação) (NETTO et al, 1986).



Figura 10: Aparato de Campo Aberto

1.7.3. Memória e LTP

Desde que a LTP (*Long-Term Potentiation* – Potenciação de Longa Duração) foi descoberta por Bliss e Lomo (1973), muitos autores se referiram a esta como sendo “o” mecanismo de formação da memória (IZQUIERDO, 1994; MALENKA & NICOLL, 1999); especialmente na literatura anterior a 1995 ou 1996 (IZQUIERDO & McGAUGH, 2000). Esse tipo de neuroplasticidade celular foi primeiramente observado no hipocampo e subseqüentemente em muitas outras regiões cerebrais. A LTP foi imediatamente reconhecida como uma mudança neuronal capaz de prover uma base para a formação da memória (IZQUIERDO & McGAUGH, 2000).

A LTP é induzida em muitas regiões cerebrais conhecidas por estarem envolvidas com tipos específicos de memória, como o hipocampo, neocórtex, núcleo caudato, cerebelo e amígdala lateral (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993; TORII et al, 1995; IZQUIERDO & MEDINA, 1997b; HUANG & KANDEL, 1998; IZQUIERDO & McGAUGH, 2000). Contudo, estas descobertas isoladas não nos permitem concluir que a LTP é responsável pela geração de traços de memória nessas regiões (IZQUIERDO & McGAUGH, 2000). No presente, a visão de que a LTP é um mecanismo que participa da formação da memória continua sendo uma hipótese (SHORS & MATZEL, 1997; IZQUIERDO & McGAUGH, 2000).

Desta forma, a LTP pode ser considerada como um “modelo parcial” de memória (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993). Mas memória é, de fato, muito mais do que LTP ou fenômenos LTP semelhantes que ocorrem na região CA1 do hipocampo (IZQUIERDO et al, 2000a). Assim, a LTP pode ser, ou deve ser, vista como um membro da família dos eventos plásticos que, em algumas regiões do cérebro, são capazes de serem realizados com a maquinaria bioquímica a sua disposição e que assemelham-se, em

muitos aspectos, aos eventos bioquímicos que ocorrem no processo de formação da memória (IZQUIERDO et al, 2000a).

1.8. Hiperargininemia, Na^+ , K^+ -ATPase e Memória

A hiperargininemia é uma doença do ciclo da uréia causada pela deficiência da enzima arginase (BRUSILOW & HORWICH, 2001). Pacientes afetados por esta doença apresentam altos níveis de arginina e compostos guanidínicos no plasma e fluídos biológicos e desenvolvem uma disfunção neurológica progressiva, apresentando como sinais característicos retardo mental e psicomotor, epilepsia e espasticidade (BRUSILOW & HORWICH, 2001; IYER et al, 1998).

A Na^+ , K^+ -ATPase é uma enzima crucial ao funcionamento normal do SNC, pois é responsável pelo transporte ativo de Na^+ e K^+ necessário para manter o gradiente iônico que é fundamental à excitabilidade neural (ERICINSKA & SILVER, 1994).

A inibição da Na^+ , K^+ -ATPase tem sido associada a diversas neuropatologias (MENINI et al, 1984; PERLMAN & GOLDSTEIN, 1984; GRISAR, 1984; PALMER et al, 1987; TSAKIRIS et al, 2000; WYSE et al, 2000). Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que aminoácidos em concentrações similares àquelas encontradas nos fluídos biológicos dos pacientes com erros inatos do metabolismo também inibem a atividade desta enzima em cérebro de ratos *in vivo* e *in vitro* (WYSE, 1995; WYSE et al, 1995a-b; WYSE et al, 1999; WYSE et al, 2001; BÜGUER, 1998; SILVA, 1999; SILVA et al, 1999; PONTES et al, 2000; STRECK et al, 2001). Além disso, Silva e colaboradores (1999) demonstraram que os compostos guanidínicos, com exceção da arginina, inibem a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase *in vitro*. Por outro lado, Sato e colegas

(1995) mostraram uma inibição desta enzima purificada a partir de cérebro de suínos pela ação de compostos geradores e/ou doadores de ON.

Evidências da literatura demonstraram que a inibição da Na^+, K^+ -ATPase nos sítios pré-sinápticos resulta na inibição da recaptação de glutamato, bem como na estimulação de sua liberação (LEES, 1991). O glutamato é neurotransmissor que apresenta um papel importante na LTP (CAIN, 1997).

Desta forma, a Na^+, K^+ -ATPase também parece estar envolvida no processo plástico de formação da memória. Em 1997, Glushchenko e Izvarina propuseram a hipótese de que um evento importante para a indução da LTP seria a despolarização das membranas celulares no SNC, por este motivo decidiram investigar a atividade da Na^+, K^+ -ATPase durante a LTP. Os resultados deste estudo mostraram que a formação e a persistência da LTP no córtex olfatório de ratos era acompanhada de mudanças significativas na atividade da Na^+, K^+ -ATPase nos neurônios e nas células gliais (GLUSHCHENKO & IZVARINA, 1997).

1.9. Objetivos

Considerando que: **a)** Pacientes com hiperargininemia apresentam acúmulo tecidual e plasmático de arginina e compostos guanidínicos, e desenvolvem progressivamente retardo mental, espasticidade e epilepsia; **b)** Há estudos sugerindo o papel dos compostos guanidínicos nas alterações cognitivas encontradas em pacientes com hiperargininemia; **c)** A arginina é o substrato para a síntese de óxido nítrico, pela ação da enzima óxido nítrico sintetase, e o excesso deste substrato leva a um aumento na síntese de óxido nítrico; **d)** O óxido nítrico em concentrações elevadas está associado à neurotoxicidade, ao aumento da produção de radicais livres, ao estresse oxidativo e à inibição da Na^+, K^+ -ATPase; **e)** A inibição da enzima Na^+, K^+ -ATPase aumenta a liberação de glutamato, que é um importante neurotransmissor envolvido na LTP; o presente trabalho tem como objetivos verificar:

- 1- O efeito da administração aguda de arginina sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase de membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos adultos.
- 2- O efeito da administração aguda de arginina 1h antes do treino, imediatamente após o treino e 1h antes do teste, sobre a memória da tarefa de esQUIVA inibitória buscando investigar, respectivamente, a aquisição, a consolidação e a evocação da memória de longa duração em ratos adultos.
- 3- A influência da administração de L-NAME, um inibidor da NOS, sobre os efeitos provocado pela administração de arginina na atividade da Na^+, K^+ -ATPase de membrana plasmática sináptica de hipocampo e na memória da tarefa de esQUIVA inibitória; buscando investigar a participação do óxido nítrico nestes parâmetros.

**A ADMINISTRAÇÃO DE ARGININA INIBE A ATIVIDADE DA
Na⁺,K⁺-ATPase EM HIPOCAMPO DE RATOS E PREJUDICA A
RETENÇÃO DA MEMÓRIA NA TAREFA DE ESQUIVA INIBITÓRIA**

Trabalho publicado em forma de artigo na revista **Brain Research** com o título: “*Arginine administration inhibits hippocampal Na⁺,K⁺-ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats*”.

Em anexo.

3. Discussão

A hiperargininemia é um erro inato do ciclo da uréia causado pela deficiência da arginase, enzima que converte a arginina em ornitina e uréia (BRUSILOW & HORWICH, 2001). A deficiência da arginase AI é uma doença autossômica recessiva que resulta em hiperargininemia (TERHEGGER et al, 1970; SNYDERMAN et al, 1977; CEDERBAUM et al, 1979; BERNAR et al, 1986; BRUSILOW & HORWICH, 1995). Devido a esta alteração metabólica no ciclo da uréia, ocorre um acúmulo tecidual e plasmático de arginina e seus metabólitos, os compostos guanidínicos (BRUSILOW & HORWICH, 2001).

As manifestações clínicas da hiperargininemia são surpreendentemente diferentes das demais deficiências enzimáticas do ciclo da uréia (TERHEGGER et al, 1969; IYER et al, 1998; BRUSILOW & HORWICH, 2001). Seus principais sintomas manifestam-se de forma progressiva e são caracterizados pela perda das habilidades motoras, aumento da espasticidade predominantemente nas extremidades inferiores, hiperreflexias e retardo mental (TERHEGGER et al, 1982; BRUSILOW & HORWICH, 2001).

Geralmente a doença apresenta-se tardiamente, no segundo ano de vida. Todavia, há uma variabilidade fenotípica, com alguns casos assintomáticos até os quatro anos de idade e outros que sugerem a ocorrência de manifestações clínicas já no primeiro ano de vida (COLOMBO, 1992; SILVA et al, 1999). Contudo, a fisiopatologia desta doença ainda não é muito bem compreendida.

A hiperamonemia sintomática, que progride para uma encefalopatia, pode vir a ocorrer em pacientes com hiperargininemia, porém os níveis

plasmáticos de amônia apresentam-se apenas três ou quatro vezes maiores que os valores normais, com níveis mais altos raramente atingindo seis vezes o valor normal (BRUSILOW & HORWICH, 2001). Assim, o aumento dos níveis de amônia pode contribuir para a alteração metabólica que causa dano cerebral, porém esse aumento é muito tênue e não é consistente em todos os pacientes afetados por esta doença.

Alguns autores atribuíram a disfunção neurológica presente nos pacientes hiperargininêmicos aos altos níveis plasmáticos de arginina e/ou seus metabólitos, os compostos guanidínicos (BRUSILOW & HORWICH, 2001; SILVA et al, 1999). A síntese dos compostos guanidínicos ocorre devido ao acúmulo de arginina nos tecidos e fluídos biológicos desses pacientes. Desta forma, a arginina é metabolizada por uma série de reações enzimáticas alternativas, formando quantidades significativas de seus metabólitos (MARESCAU et al, 1990).

A hipótese de existir uma correlação entre os compostos guanidínicos e as alterações neurológicas desta doença surgiu porque alguns compostos guanidínicos, como o ácido guanidino acético, são conhecidos por serem convulsivantes endógenos; e outros, como o ácido α -guanidino glutárico, são capazes de promover a síntese de espécies reativas de oxigênio, cujos radicais livres podem causar dano celular aos neurônios (MORI, 1996). A metilguanidina, que é conhecida por ser uma toxina urêmica e convulsivante, também apresenta a capacidade de gerar radicais livres (MORI, 1996). Desta forma, o aumento nos níveis plasmáticos de compostos guanidínicos nas doenças neurológicas, como a epilepsia, pode ocorrer devido a síntese de radicais livres, que parecem ser, pelo menos em parte, responsáveis pela patogênese destas doenças (MORI, 1996).

Entre outras alterações causadas pelos compostos guanidínicos quando em excesso, iremos ressaltar, em especial, o efeito inibitório dos metabólitos metilguanidina, N- α -acetil arginina, homoarginina e ácido arginínico sobre a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase cerebral (MATSUMO & MORI, 1976; SILVA et al, 1999). Contudo, o(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(is) estes compostos atuariam nos pacientes com hiperargininemia e o quão responsáveis eles seriam pelo dano cerebral presente nesta doença ainda é pouco compreendido.

Neste estudo, utilizamos um modelo experimental agudo da hiperargininemia descrito por Buchmann e colaboradores (1996), no qual 30 minutos após a administração de arginina (0,8 g/Kg), ocorre um aumento nos níveis plasmáticos de arginina, que atingem níveis sete a dez vezes maiores quando comparados à concentração normal, e um aumento na concentração cerebral de arginina, atingindo valores duas a três vezes maiores que a concentração normal. Este modelo nos pareceu bastante representativo, pois comparando-se os níveis plasmáticos de arginina de um indivíduo normal com os níveis plasmáticos de pacientes com hiperargininemia, observa-se um aumento na concentração de arginina de aproximadamente dez vezes (TERHEGGEN et al, 1982).

Buchmann e colaboradores (1996) também salientaram o papel da arginina como precursora da síntese do óxido nítrico. Em outros experimentos, nos quais utilizaram o mesmo modelo animal utilizado neste estudo, estes pesquisadores demonstraram que houve um aumento da concentração de citrulina no cérebro de ratos após a administração de arginina. Como o metabolismo da citrulina, da arginina e do óxido nítrico estão correlacionados pelo ciclo citrulina-óxido nítrico, demonstrado na figura 5, o aumento dos níveis de arginina e de citrulina no cérebro podem indicar um aumento da síntese de óxido nítrico neste tecido.

Nossos resultados demonstraram que a administração aguda de arginina produz uma redução de 52% na atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos *in vivo*. Este resultado pode ser observado na figura 1 do artigo anexado. Em um estudo anterior realizado por Silva e colaboradores (1999), foi demonstrado que a adição de arginina *in vitro*, no meio de incubação, não alterou a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase de membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos, indicando que a arginina *per se* não apresenta um efeito direto sobre esta enzima. Portanto, os resultados do presente trabalho, que mostram uma diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase após a administração aguda de arginina, sugerem que este aminoácido age de forma indireta sobre a enzima, através de um ou mais mecanismos ainda desconhecidos.

No presente trabalho também verificamos o efeito da administração aguda de L-NAME sobre atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos. O L-NAME é um potente inibidor sintético da óxido nítrico sintetase (NOS), é análogo ao substrato, a L-arginina, e age como agonista competitivo da arginina, pois compete com esta pelo sítio ativo da NOS (SHINDE et al, 2000). Nossos resultados mostram que o L-NAME não alterou a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase na dose testada (2 mg/Kg), mas quando co-administrado com a arginina preveniu a redução na atividade da enzima causada por este aminoácido. Este resultado pode ser observado na Figura 1 do artigo.

Evidências na literatura mostraram que a arginina aumenta a produção de óxido nítrico em fatias cerebrais de ratos e que altas concentrações de óxido nítrico estão associadas com neurotoxicidade, possivelmente através de atividade excitotóxica (SARTI et al, 1999; BRUNORI, 2001). Também foi relatado que o óxido nítrico inibe o transporte de elétrons através da cadeia respiratória (MORENO & PRYOR,

1995; KING et al, 1992), o que poderia diminuir a síntese de ATP e aumentar a produção de radicais livres. Alguns estudos demonstraram que o estresse oxidativo inibe a Na^+, K^+ -ATPase *in vivo* (JENSEN & NÖRBY, 1988) e *in vitro* (BOLDYREV et al, 1990). Mais recentemente, estudos realizados em nosso grupo mostraram que a administração aguda de arginina diminui a atividade da Na^+, K^+ -ATPase de cérebro de ratos, possivelmente pela produção de radicais livres induzidos pela síntese de óxido nítrico (WYSE et al, 2001).

Dados da literatura sugerem que o estresse oxidativo é um importante fator na patogênese de doenças neurológicas, como doença de Parkinson, Alzheimer, esclerose múltipla e acidente vascular cerebral (HALLIWELL, 1996). Há também evidências indicando que na hiperargininemia ocorre uma produção excessiva de óxido nítrico (HEALES et al, 1999). Por outro lado, o aumento da síntese de óxido nítrico tem um importante papel no dano neuronal encontrado em diversas doenças neurodegenerativas tais como Parkinsonismo, demência associada a Alzheimer e AIDS (LIPTON et al, 1993; SHINDE et al, 2000).

Considerando que a Na^+, K^+ -ATPase é inibida pelo estresse oxidativo, é possível que o efeito protetor produzido pelo L-NAME sobre esta enzima possa ter sido mediado pela sua habilidade de prevenir o desenvolvimento do estresse oxidativo (AVROVA et al, 1999). Este resultado está em concordância com diversos estudos que mostram o efeito neuroprotetor do L-NAME em modelos de isquemia cerebral e em muitas outras circunstâncias neurotóxicas (DAWSON & SNIDER, 1994; REGLI et al, 1994; MONCADA et al, 1992; CARREAU et al, 1994). O L-NAME é capaz de prevenir a acidose intracelular no cérebro durante isquemia focalizada em coelhos (REGLI et al, 1994). A administração de L-NAME também protege os neurônios hipocâmpais da região CA1 da toxicidade induzida pela injeção local de NMDA em ratos (MONCADA et al, 1992) e reduz o tamanho

do infarto após isquemia cerebral focal em camundongos (CARREAU et al,1994).

Outro enfoque que decidimos investigar neste trabalho foi o efeito da administração aguda de arginina sobre a memória da tarefa de esquiva inibitória. Nossos resultados, que podem ser visualizados na Tabela 1 do artigo, mostraram que a arginina diminuiu a performance da tarefa de esquiva inibitória nos três diferentes momentos avaliados: 1 h antes do treino, imediatamente após o treino e 1 h antes do teste. Isso significa que a arginina, em níveis plasmáticos similares àqueles encontrados nos pacientes com hiperargininemia, afeta diretamente e respectivamente o aprendizado, a consolidação e a evocação da memória da tarefa de esquiva inibitória em ratos.

Também observamos o efeito da administração aguda de arginina na tarefa de campo aberto, cujos resultados estão demonstrados na Tabela 2 do artigo em anexo. Os animais tratados com arginina 1 h antes da sessão de treino não apresentaram alterações nos parâmetros avaliados, o que sugere que o comportamento observado na tarefa de esquiva inibitória não ocorreu devido a alterações na atividade motora dos animais.

Posteriormente, investigamos a influencia do L-NAME sobre o efeito causado pela administração aguda de arginina na tarefa de esquiva inibitória. Buscamos, com isso, verificar a participação do óxido nítrico nestes parâmetros. Assim, utilizamos 4 grupos: grupo I (controle), grupo II (Arg), grupo III (L-NAME) e grupo IV (Arg + L-NAME), como já descrito anteriormente no artigo em anexo. Observamos que o L-NAME isoladamente não alterou o comportamento dos animais quando comparado ao grupo controle. A arginina diminuiu a performance dessa tarefa; e a co-administração de arginina e L-NAME causou um aumento da memória na tarefa de esquiva inibitória imediatamente após o treino e 1 h

antes do teste, como pode-se observar nas Figuras 2 e 3 do artigo anexado. Esse foi um resultado inesperado, pois trabalhamos com a hipótese de que a administração de L-NAME exercesse um contra-efeito sobre a administração de arginina, ou seja, esperávamos que a performance do grupo Arg + L-NAME nesta tarefa fosse semelhante a do grupo controle. Por outro lado, a co-administração de Arg e L-NAME, em condições nas quais a NOS esteja inibida, poderia desviar o metabolismo da arginina para a síntese de poliaminas. Neste contexto, um recente estudo realizado por Rubin e colaboradores (2000), demonstrou que a microinjeção intra-hipocampal bilateral de espermidina, um agonista das poliaminas, causa um aumento no tempo de latência da tarefa de esquivar inibitória, sugerindo que as poliaminas podem, de alguma forma, estar envolvidas na modulação do aprendizado e da memória. A rota metabólica que correlaciona a arginina com a síntese de poliaminas pode ser observada na Figura 6, onde estão demonstrados os destinos metabólicos da arginina. Desta forma, como o modelo de hiperargininemia agudo proposto por Buchmann (1996) eleva significativamente os níveis plasmáticos de arginina, e a co-administração de Arg e L-NAME inibe a síntese de óxido nítrico pela NOS, acreditamos que o excesso de arginina presente poderia ser desviado para uma rota alternativa, como a rota de síntese das poliaminas.

Nossos resultados estão de acordo com diversos trabalhos publicados na literatura nos quais foi demonstrado que a Na^+, K^+ -ATPase e a memória são alteradas pelo óxido nítrico e pelo estresse oxidativo (BOLDYREV et al, 1990; CANTUTI-CASTEWLVETRI et al, 2000; HEALES et al, 1999; JENSEN & NÖRBY, 1988; LEES, 1991,1993; SATO et al, 1995). A rota metabólica da NOS, que forma radicais livres ativada pelo glutamato, contribui significativamente para o desenvolvimento do estresse oxidativo nas células nervosas (AVROVA et al, 1999). O óxido nítrico gera compostos ou doadores de óxido nítrico que, como previamente relatado,

têm a capacidade de inibir a Na^+, K^+ -ATPase do córtex cerebral de suínos; e essa inibição pode ser prevenida pela adição da enzima superóxido dismutase, um varredor de radicais livres de óxido nítrico, e pela adição de compostos sulfidríla (SH) (SATO et al, 1995). Também foi proposto que o óxido nítrico e/ou produtos derivados do óxido nítrico, como o peróxinitrito, podem inibir a atividade da Na^+, K^+ -ATPase por interagirem com grupos SH que estão presentes no sítio ativo desta enzima (SATO et al, 1995; COETZEE et al, 1994).

Estudos sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase demonstraram que o inibidor da NOS, o L-NAME, exerce um efeito protetor em sinaptossomas de estriado e córtex cerebral; e que a enzima pode ser inativada como resultado do estresse oxidativo nesses tecidos (AVROVA et al, 1999; ZHOU et al, 1997; MARK et al, 1995). A exposição ao glutamato diminuiu significativamente a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em sinaptossomas de diversas estruturas cerebrais e, em especial, no hipocampo. Além disso, a presença de L-NAME no meio de incubação praticamente aboliu a inativação da enzima em sinaptossoma de córtex cerebral (AVROVA et al, 1999). Mais recentemente, Wyse e colaboradores (2001) demonstraram que a administração aguda de arginina (na mesma dose utilizada neste estudo) inibe a atividade da Na^+, K^+ -ATPase de membrana plasmática sináptica, aumenta a quimioluminescência e diminui a capacidade antioxidante tecidual total (TRAP - *total radical-trapping antioxidant parameters*) em cérebro de ratos; e esses efeitos foram prevenidos pela administração de L-NAME.

Desta forma, de acordo com a recente publicação de Cantuti-Castewlvetri e colaboradores (2000) na qual doenças neurodegenerativas associadas à idade estão relacionadas a vários estágios de danos comportamentais, e que os radicais livres e o estresse oxidativo estão entre os principais candidatos responsáveis pela produção de mudanças

neuronalis que promovem esse déficit comportamental, é possível, então, sugerirmos que um dos mecanismos pelos quais a arginina é neurotóxica na hiperargininemia seja através da inibição da Na^+, K^+ -ATPase, que é provavelmente secundária à formação de óxido nítrico e à produção de radicais livres.

Quanto a correlação entre a Na^+, K^+ -ATPase e a formação da memória, a literatura oferece evidências de que a atividade da enzima apresenta um papel importante na LTP (*long-term potentiation* – potenciação de longa duração) (GLUSHCHENKO & IZVARINA, 1997), que é um fenômeno plástico similar ao processo de memória (IZQUIERDO & MEDINA, 1995b). Evidências também mostraram que o óxido nítrico, quando em concentrações normais, tem um papel importante na plasticidade sináptica, agindo como mensageiro retrógrado no fenômeno neurofisiológico da LTP (SNYDER, 1992; ZORUMSKI & IGUMI, 1993; SHINDE et al, 2000). Desta maneira, a molécula de óxido nítrico apresenta um caráter ambíguo, pois regula importantes efeitos fisiológicos quando em baixas concentrações, porém, quando em altos níveis, apresenta efeitos citotóxicos (SHINDE et al, 2000).

Se a ação da arginina e do óxido nítrico (e possivelmente dos radicais livres) sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase influencia no aprendizado e na memória da tarefa de esquiva inibitória ainda deverá ser investigado em estudos subseqüentes. Os resultados apresentados neste estudo mostraram uma diminuição significativa da atividade da Na^+, K^+ -ATPase no hipocampo dos animais após a administração aguda de arginina. De acordo com o trabalho de Glushchenko e Izvarina (1997), a Na^+, K^+ -ATPase apresenta um papel durante a formação e persistência da LTP. Como a LTP é um evento plástico que produz alterações bioquímicas muito similares àquelas que ocorrem na formação da memória (IZQUIERDO & McGAUGH, 2000) e pode, inclusive, estar correlacionada a esta

(IZQUIERDO et al, 2000a), sugerimos a possibilidade de que a enzima Na^+, K^+ -ATPase possa participar dos mecanismos de formação da memória. Contudo, estudos subseqüentes também deverão ser realizados para provar esta hipótese.

Em suma, o presente estudo demonstra que a administração aguda de arginina *in vivo* diminuiu significativamente a atividade da Na^+, K^+ -ATPase de membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos adultos. Além disso, afetou o desempenho dos animais na aquisição, consolidação e evocação da memória da tarefa de esquiva inibitória. O L-NAME, que é um inibidor da ONS, preveniu ambos efeitos. Assumindo a possibilidade de que isso possa também ocorrer em pacientes hiperargininêmicos, nossos resultados podem ser relevantes para explicar, ao menos em parte, a disfunção neurológica associada à hiperargininemia.

4. Conclusões:

Os estudos realizados para avaliar a atividade da Na^+, K^+ -ATPase de membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos Wistar com 60 dias de vida, permitem as seguintes conclusões:

1. A administração de arginina na dose de 0,8 g/Kg inibiu a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em 52%.
2. A administração de L-NAME na dose de 2 mg/Kg não alterou a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, mas preveniu a redução da atividade da enzima causada pela arginina quando co-administrado a este aminoácido.

Os testes comportamentais realizados com ratos Wistar com 60 dias de vida, permitiram as seguintes conclusões:

1. A administração de arginina na dose de 0,8 g/Kg não alterou a atividade motora e o comportamento da tarefa de campo aberto quando comparados ao grupo controle.
2. A administração de arginina na dose de 0,8 g/kg diminuiu significativamente a formação, a consolidação e a evocação da memória da tarefa de esQUIVA inibitória quando administrada 1h antes do treino, imediatamente após o treino e 1h antes do teste, respectivamente.
3. A administração de L-NAME na dose de 2 mg/Kg não alterou a formação, a consolidação e a evocação da memória da tarefa de esQUIVA inibitória quando administrado 1h antes do treino, imediatamente após o treino e 1h antes do teste, respectivamente.

4. A administração concomitante de arginina e L-NAME, nas doses utilizadas anteriormente, 1h antes do treino, imediatamente após o treino e 1h antes do teste, não somente reverteu o efeito amnésico causado pela arginina, como também melhorou a evocação da memória da tarefa de esquiva inibitória.

Assumindo a possibilidade de que os resultados obtidos neste trabalho reproduzam, parcialmente, o que ocorre em pacientes hiperargininêmicos, estes achados poderão ser úteis para elucidar parte dos mecanismos responsáveis pela disfunção neurológica associada à hiperargininemia.

5. Referências Bibliográficas:

- ASH, D.E.; SCOLNICK, L.R.; KANYO, Z.F.; VOCKLEY, J.G.; CEDERBAUM, S.D.; CHRISTIANSON, D.W. (1998): Molecular basis of hyperargininemia: structure-function consequences of mutations in human liver arginase. **Mol. Genet. Metab.** 64: 243-249.
- AVROVA, N.F.; SHESTAK, K.I.; ZAKHAROVA, I.O.; SOKOLOVA, T.V.; LEONT'EV, V. G. (1999): The difference in the effect of glutamate and NO synthase inhibitor on free calcium concentration and Na⁺, K⁺-ATPase activity in synaptosomes from various brain regions. **Neurochem. Res.** 24:1101-1106.
- BATSHAW, M.L.; THOMAS, G.H.; BRUSILOW, S.W. (1981): New approaches to the diagnosis and treatment of inborn errors of the urea synthesis. **Pediatrics** 68: 290-297.
- BECKMAM, J.S.; CARSON, M.; SMITH, C.D.; KOPPENOL, W.H. (1993): ALS, SOD and peroxynitrite. **Nature** 364:584.
- BERNAR, J.; HANSON, R.A.; KERN, R.; PHOENIX, B.; SHAW, K.N.F.; CEDERBAUM, S.D. (1986): Arginase deficiency in a 12-year old boy with mild impairment of intellectual function. **J. Pediatr.** 108: 432-435.
- BERTORELLO, A. M. & KATZ, A. I. (1995): Regulation of Na⁺, K⁺-pump activity: pathways between receptors and effectors. **NIPS**, 10: 253-259.
- BLISS, T.V.P. & LOMO, T. (1973): Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **J. Physiol. London**, 232: 331-356.
- BLISS, T.V.P. & COLLINGRIDGE, G.L. (1993): A synaptic model of memory: long-term potentiation. **Nature** 361: 31-39.
- BOLDYREV, A.A. (1985): Na⁺, K⁺-ATPase. In: **Science and Technology**, vol. 17. 5-120.
- BOLDYREV, A.A.; LOPINA, O.D.; FEDESOVA, N.U. (1990): Na⁺, K⁺-ATPase: radiation inactivation studies. **Biochem. Int.** 21: 45-52.

- BREDET, D.S. (1999): Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. **Free Radic. Res.** 31(6):577-96.
- BRUNELLI, M.; GARCIA, G.M.; MOZZACHIODI, R.; SCURI, R.; ZACCARDI, M.L. (1997): Neurobiological principles of learning and memory. **Arch. Ital. Biol.** 135:15-36.
- BRUSILOW, S.W. & HORWICH, A.L. (1995): Urea cycle enzymes. In: SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L., SLY, W.S. AND VALLE, D. Eds. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, 7th edn. New York, McGraw-Hill, 621-663.
- BRUSILOW, S.W. & HORWICH, A.L. (2001): Urea cycle enzymes. In: SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L., SLY, W.S. AND VALLE, D. eds. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, 8th edn. New York, McGraw-Hill, 1909-1963.
- BUCHMANN, I.; MILAKOFSKY, L.; HARRIS, N.; HOFFORD, J.M.; VOGEL, W.H. (1996). Effect of arginine administration on plasma and brain levels of arginine and various related amino compounds in the rat. **Pharmacology** 53: 133-142.
- BÜRQUER, C. (1998): Estudos experimentais na Doença do Xarope do Bordo: Efeito dos aminoácidos de cadeia ramificada e seus cetoácidos na atividade da Na⁺,K⁺-ATPase de membrana plasmática sináptica de córtex cerebral de ratos. Tese de mestrado do curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- CAIN, D.P. (1997): LTP, NMDA, genes and learning. **Curr. Opin. Neurobiol.** 7(2):235-242.
- CANFIELD, V.A.; OKAMATO, C.T.; CHOW, D.; DORFMAN, J.; GROS, P.; FORTE, J.G.; LEVENSON, R. (1991): The sodium pump: recent developments. In: KAPLAN, J.H.; DE WEER, P. eds. **Society of General Physiologists Series**, Vol. 46 (Part I). Rockefeller University Press, New York, 89-98.

- CANTUTI-CASTEWLVETRI, I.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J.A. (2000): Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. **Int. J. Dev. Neurosci.** 18: 367-381.
- CARREAU, A.; DUVAL, D.; POIGNET, H.; SCATTON, B.; VIGÉ, X.; NOWICKI, J.P. (1994): Neuroprotective efficacy of N^ω-nitro-L-arginine after focal cerebral ischemia in the mouse and inhibition of cortical nitric oxide synthase. **Eur. J. Pharmacol.** 256: 241-249.
- CEDERBAUM, S.D.; SHAW, K.N.F.; VALENTE, M. (1977): Hyperargininemia. **J. Pediatr.** 90(4): 569-573.
- CEDERBAUM, S.D.; SHAW, K.N.F.; SPECTOR, E.B.; VERITY, M.A.; SNODGRASS, P.J.; SUGARMAN, G.I. (1979): Hyperargininemia due to arginase deficiency. **Pediatr. Res.** 13: 827-833.
- CEDERBAUM, S.D.; MOEDJONO, S.J.; SHAW, K.N.F.; NAYLOR, E.W.; WALSER, M.; CARTER, M. (1982): Treatment of hyperargininemia due to arginase deficiency. **J. Inter. Metab. Dis.** 5:95-99.
- CERONE, R.; CORUSO, U.; BARABINO, A.; et al (1997): Hyperargininemia: pre-natal diagnosis and treatment from birth. In: DEYN, P.P.; MARESCAU, B.; QURESHI, I.A.; MORI, A. eds. **Guanidine Compounds in Biology and Medicine II**. London, John Libbey, 71-75.
- CHERKIN, A. (1968): Kinetics of memory consolidation: role of amnesic treatment parameters. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 63: 1094-1101.
- CHOI, D.W. & ROTHMAN, S.M. (1990): The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. **Annu. Rev. Neurosci.** 13: 171-182.
- COETZEE, W.; ICHIKAWA, H.; HEARSE, D. (1994): Oxidant stress inhibits Na-Ca-exchange current in cardiac myocytes: mediation by sulfhydryl groups? **Am. J. Physiol.** 266: H909-H919.
- COLOMBO, J.P. (1992): Argininemia: clinical and biochemical aspects. In: DEYN, P.P.; MARESCAU, B.; SATLON, V.; QURESHI, I.A. eds. **Guanidine Compounds in Biology and Medicine**, Vol. 1. Guildford, UK, John Libbey & Company Ltd., 343-348.

- DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M.; LONDON, E.D.; BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. (1991): Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. **Proc. Natl. Acad.** 88: 6371-6386.
- DAWSON, V.L. & DAWSON, T.M. (1996): Nitric oxide neurotoxicity. **J. Chem. Neuroanat.** 10: 179-190.
- DAWSON, T.M. & SNIDER, S.H. (1994): Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J. Neurosci.** 14: 5147-5159.
- DEAN, R.B. (1941): Theories of electrolyte equilibrium in muscle. **Biol. Symp.** 3: 331-348.
- DE DEYN, P.P.; MARECAU, B.; QURESHI, I.A.; et al (1997): Hyperargininemia: a treatable inborn error of metabolism. In: DE DEYN, P.P.; MARECAU, B.; QURESHI, I.A.; MORI, A. eds. **Guanidino Compounds in Biology and Medicine II**. London, John Libbey, 53-69.
- DELGADO, J.C. & YUNIS, E.J. (2001): The major histocompatibility complex and disease. In: HENRY, J.B. ed. **Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**, 20th edition. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 949-962.
- EICHENBAUM, H. (1996): Is the rodent hippocampus just for 'place'? **Curr. Opinion Neurobiol.** 6: 187-195.
- EICHENBAUM, H.; SCHOENBAUM, G.; YOUNG, G.; BUNSEY, M. (1996): Functional organization of the hippocampal memory system. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93: 13500-13507.
- EICHENBAUM, H. (1999): The hippocampus and mechanisms of declarative memory. **Behav. Brain Res.** 103: 123-133.
- ERICINSKA, M. & SILVER, I.A. (1994): Ions and energy in mammalian brain. **Prog. Neurobiol.** 43: 37-71.
- FEILLET, F. & LEONARD, J.V. (1998): Alternative pathway therapy for urea cycle disorders. **J. Inher. Metab. Dis.** 21:101-111.
- FUSTER, J.M. (1998): Distributed memory for both short and long term. **Neurobiol. Learn Mem.** 70: 268-274.
- GARROD, A.E. (1909): **Inborn Errors in Metabolism**, Oxford University Press.

- GERRING, K. (1990): Subunit assembly and functional maturation of Na⁺,K⁺-ATPase. **J. Membrane Biol.** 155: 109-121.
- GLASS, R.D.& KNOX, W.E. (1973): Arginase isoenzymes of rat mammary gland, liver and other tissues. **J. Biol. Chem.** 248: 5785-5789.
- GLUSHCHENKO, T.S. & IZVARINA, N.L. (1997): Na⁺,K⁺-ATPase activity in neurons and glial cells of the olfactory cortex of rat brain during the development of long-term potentiation. **Neurosci. Behav. Physiol.** 27: 49-52.
- GLYNN, I.M.; KARLISH, S.J.D. (1975): The sodium pump. **Ann. Rev. Physiol.** 37: 13-55.
- GOLD, P.E. & MCGAUGH, J.L. (1975): A single-trace, two-process view of memory storage processes. In: DEUTSCH, D. & DEUTSCH, J.A. eds. **Short-term Memory**. New York, Academic Press, 355-378.
- GOLD, P.E. (1986): The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. **Behav. Neural Biol.** 46: 87-98.
- GOLDMAN-RACKIC, P. (1992): Prefrontal cortical dysfunction in schizophrenia: the relevance of working memory. In: CARROLL, B.J.; BARRET, J.E. eds. **Psychopathology and the Brain**. New York, Raven Press, 1-23.
- GRISAR, T. (1984): Glial and neuronal Na⁺-K⁺ pump in epilepsy. **Ann. Neurol.** 16: 128-134. Suppl.
- GRODY, W.W.; ARGYLE, C.; KERN, R.M.; et al (1989): Differential expression of the two human arginase genes in hyperargininemia: enzymatic pathologic and molecular analysis. **J. Clin. Invest.** 83:602-609.
- GRODY, W.W.; KERN, R.M.; KLEIN, D.; et al (1993): Arginase deficiency manifesting delayed clinical sequelae and induction of a kidney arginase isozyme. **Hum. Genet.** 91:1-5.
- HABIBA, A.; BLANCO, G.; MERCER, R.W. (2000): Expression, activity and distribution of Na⁺,K⁺-ATPase subunits during in vitro neuronal induction. **Brain Res.** 875(1-2):1-13.
- HALL, C.S. (1934): Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **J. Comp. Psychol.** 18: 385-403.

- HALLIWELL, B. (1996): Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. **Biochem. Soc. Trans.** 24: 1023-1027.
- HANSEN, O. (1984): Interaction of cardiac glycosides with (Na⁺ + K⁺)-activated ATPase. A biochemical link to digitalis induced inotropy. **Pharmac. Rev.** 36: 143-163.
- HARAGUCHI, Y.; TAKIGUCHI, M.; AMAYA, Y.; KAWAMOTO, S.; MATSUDA, I.; MORI, M. (1987): Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human liver arginase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 84: 412-415.
- HATTORI, Y.; CAMPBELL, E.B.; GROSS, S.S. (1994): Argininosuccinate synthetase mRNA and activity are induced by immunostimulants in vascular smooth muscle. Role in the regeneration or arginine for nitric oxide synthesis. **J. Biol. Chem.** 269: 9405-9408.
- HEALES, S.J.R.; BOLAÑOS, J.P.; STEWART, V.C.; BROOKES, P.S.; LAND, J.M.; CLARK, J.B. (1999): Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. **Biochim. Biophys. Acta.** 1410: 215-228.
- HINE, B. & PAOLINO, R.M. (1970): Retrograde amnesia: production of skeletal but not cardiac response gradient by electroconvulsive shock. **Science** 109: 1224-1226.
- HUANG, Y.Y. & KANDEL, E.R. (1998): Postsynaptic induction and PKA-dependent expression of LTP in the lateral amygdala. **Neuron** 21: 169-178.
- IYER, R.; JENKINSON, C.P.; VOCKLEY, J.G.; KERN, R.M.; GRODY, W.W.; CEDERBAUM S.D. (1998): The human arginases and arginase deficiency. **J. Inher. Metab. Dis.** 21(1): 86-100.
- IZQUIERDO, I.; BEAMISH, D.G.; ANISMAN, H. (1979): Effect of an inhibitor of dopamine-beta-hydroxylase on the acquisition and retention of four different avoidance tasks in mice. **Psychopharmacol.** 63: 173-178.
- IZQUIERDO, I. (1989): Different forms of post-training memory processing. **Behav. and Neural Biol.** 51: 171-202.
- IZQUIERDO, I. (1992): The neurobiology of memory consolidation. **Neurosciences**, 18: 1-11.

- IZQUIERDO, I.; da CUNHA, C.; ROSAT, R.; FERREIRA, M.B.C.; JERUSALINSKY, D.; MEDINA, J.H. (1992): Neurotransmitter receptors involved in memory processing by amygdala, medial septum and hippocampus of rats. **Behav. Neural Biol.** 58: 16-25.
- IZQUIERDO, I. (1994): Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory. **FASEB J.** 8: 1139-1145.
- IZQUIERDO, I. & MEDINA, J.H. (1995a): Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. **Neurobiol. Learn Mem.** 63: 19-32.
- IZQUIERDO, I. & MEDINA, J.H. (1995b): Retrograde messengers, long-term potentiation and memory. **Brain Res. Rev.** 21: 185-194.
- IZQUIERDO, I. & MEDINA, J.H. (1997a): Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol. Learn Mem.** 68: 285-316.
- IZQUIERDO, I & MEDINA, J.H.(1997b): The biochemistry of memory and its regulation by modulation processes. **Psychobiol.** 25: 1-9.
- IZQUIERDO, I; QUILLFELDT, J.A.; ZANATTA, M.S.; QUEVEDO, J.; SCHAEFFER, E.; SCHMITZ, P.K.; MEDINA, J.H. (1997): Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. **Eur. J. Neurosci.** 9: 786-793.
- IZQUIERDO, I.; IZQUIERDO, L.A.; BARROS, D.M.; MELLO e SOUZA, T.; de SOUZA, M.M.; QUEVEDO, J.; RODRIGUES, C.; SANT'ANNA, M.K.; MADRUGA, M.; MEDINA, J.H. (1998a): Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short- and long-term memory. **Behav. Pharmacol.** 9: 421-427.
- IZQUIERDO, I.; BARROS, D.M.; MELLO e SOUZA, T.; de SOUZA, M.M.; IZQUIERDO, L.A.; MEDINA, J.H. (1998b): Mechanisms for memory types differ. **Nature** 393: 635-636.
- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H.; ARDENGHI, P.G.; BARROS, D.M.; BEVILAQUA, L.; IZQUIERDO, L.A.; MELLO e SOUZA, T.; QUEVEDO, J.; SCHRÖDER, N.

- (1998c): Memory processing and its shifting maps: interaction between monoamines and events depending on glutamatergic transmission. In: BENINGER, R.; ARCHER, T.; PALOMO, T. eds. **Interactive Monoaminergic Basis of Brain Disorders**. London, Complutense, Madrid and Farrand, 517-547.
- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, L.A.; BARROS, D.M.; de SOUZA, M.M.; MELLO e SOUZA, T. (1998d): Short and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic system in the rat brain. **Neurobiol. Learn Mem.** 69: 219-224.
- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H.; VIANNA, M.R.M.; IZQUIERDO, L.A.; BARROS, D.M. (1999a): Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behav. Brain Res.** 103: 1-11.
- IZQUIERDO, I. & MCGAUGH, J.L. (2000): Behavioral pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behav. Pharmacol.** 11: 517-534.
- IZQUIERDO, I.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, L.A.; et al (2000a): What can go wrong when memory fails: the main biochemical events underlying consolidation and retrieval in rats. In: ARCHER, T.; PALOMO, T.; BENINGER, R. eds. **Neurodegenerative Disorders and their Treatment**. Madrid, Complutense, in press.
- IZQUIERDO, I.; BARROS, D.M.; ARDENGHI, P.G.; et al (2000b): Different hippocampal molecular requirements for short- and long-term retrieval of one-trial avoidance learning. **Behav. Brain Res.** 111: 9.
- JACOBSEN, C.F. (1936): Studies of cerebral function in primates. **Comp. Psychol. Monogr.** 13: 1-68.
- JENKINSON, C.P.; GRODY, W.W.; CEDERBAUM, S.D. (1996): Comparative properties of arginases. **Comp. Biochem. Physiol.** 114B: 107-132.
- JENSEN, J. & NÖRBY, J.G. (1988): Membrane-bound Na⁺,K⁺-ATPase: target size and radiation inactivation size of some of its enzymatic reaction. **J. Biol. Chem.** 263: 18063-18070.

- KAYSEN, G.A. & STRECKER, H.J.(1973): Purification and properties of arginase of rat kidney. **Biochem. J.** 133: 779-788.
- KING, P.A.; ADNERSON, V.E.; EDWARDS, J.O.; GUSTAFSON, G.; PLUMB, R.C.; SUGGS, J.W. (1992): A stable solid that generates hydroxyl radical upon dissolution in aqueous solution: reaction with proteins and nucleic acids. **J. Am. Chem. Soc.** 114: 5430-5432.
- LEES, G.J. (1991): Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. **Brain Res. Rev.** 16: 283-300.
- LEES, G.J. (1993): Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. **Neuroscience** 54: 287-322.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L. and COX, M.M. (1993): Amino acid oxidation and the production of urea. In: **Principles of Biochemistry**, 2nd edn. New York, Worth Publishers, 506-541.
- LEONARD, J.V. (1995): Urea cycle disorders. In: FERNANDES, J.; SAUDUBRAY, J.M.; VAN DEN BERGHE, G. eds. **Inborn Metabolic Disease: Diagnosis and Treatment**, 2nd edn. Berlin, Springer-Verlag, 167-176.
- LINCOLN, J.; HOYLE, C.H.V.; BURNSTOCK, G. (1997): Nitric Oxide in health and disease. **Biochemical Research Topics**. Cambridge, Cambridge University Press.
- LINGREL, J.B. & KUNTZWEILER, T. (1994): Na⁺,K⁺-ATPase. **J. Biochem. Chem.** 269(31): 196599-196662.
- LIPTON, S.A.; CHOI, Y.B.; PAN, Z.H.; LEI, S.Z.; CHEN H.S.V.; SUCHER, N.J.; LASCALAZO, J.; SINGEL, D.J.; STAMLER, J.S. (1993): A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso compounds. **Nature** 364: 626.
- LORENZINI, C.A.; BALDI, E.; BUCHERELLI, C.; et al (1996): Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: a tetrodotoxin functional inactivation study. **Brain Res.** 730: 32-39.

- MAGISTRETTI, P.J. & PELLERIN L. (2000): Functional brain imaging: role metabolic coupling between astrocytes and neurons. **Rev. Med. Suisse Romande**, 120(9):739-42.
- MALENKA, R.C. & NICOLL, R.A. (1999): Long-term potentiation – a decade of progress? **Science** 285: 1870-1874.
- MARESCAU, B.; PINTENS, J.; LOWENTHAL, A.; TERHEGGEN, H.G. (1979): Excretion of keto- δ -guanidinovaleric acid and its cyclic form in patients with hyperargininemia. **Clin. Chim. Acta.** 98: 35.
- MARESCAU, B. & LOWENTHAL, A. (1981): Isolation and identification of some guanidino compounds in the urine of patients with hyperargininaemia by liquid chromatography, thin-layer chromatography and gas chromatography mass spectrometry. **J. Chromatogr.** 224: 185.
- MARESCAU, B.; DE DEYN, P.P.; LOWENTHAL, A.; QURESHI, I.A.; ANTONOZZI, I.; BACHMANN, C.; CEDERBAUM, S.D.; CERONE, R.; CHAMOLES, N.; COLOMBO, J.P.; HYLAND, K.; GATTI, R.; KANG, S.S.; LETARTE, J.; LAMBERT, M.; MIZUTANI, N.; POSSEMIERS, I.; REZVANI, I.; SNYDERMAN, S.E.; TERHEGGEN, H.G.; YOSHINO, M. (1990): Guanidino compound analysis as a complementary diagnostic parameter for hyperargininemia: follow-up of guanidino compound levels during therapy. **Pediatr. Res.** 27: 297-303.
- MARESCAU, B.; DE DEYN, P.P.; QURESH, I.A.; et al (1992a): The pathobiochemistry of uremia and hyperargininemia further demonstrates a metabolic relationship between urea and guanidinosuccinic acid. **Metabolism** 41: 1021-1024.
- MARESCAU, B.; DE DEYN, P.P.; QURESH, I.A.; ANTONOZZI, I.; BACHMANN, C.; CEDERBAUM, S.D.; et al (1992b): Guanidino Compounds in hyperargininemia. In: DEYN, P.P.; MARESCAU, B.; SATLON, V.; QURESHI, I.A. eds. **Guanidine Compounds in Biology and Medicine**, Vol. 1. Guildford, UK, John Libbey & Company Ltd., 363-371.

- MARK, R.J.; HENSLEY, K.; BUTTERFIELD, D.A.; MATTSON, M.P. (1995): Amyloid β -peptide impairs ion-motive ATP-ase activities, evidence for a role in loss of neuronal homeostasis. **J. Neurosci.** 15: 6239-6249.
- MARKS, D.B.; MARKS, A.D. and SMITH, C.M. (1996): Fate of amino acid nitrogen: urea cycle. In: **Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach.** Baltimore, Williams & Wilkins, 581-593.
- MARKOWITSCH, H.J. (1997): Varieties of memory system, structure, mechanisms of disturbance. **Neurol. Psychiat. Brain Res.** 2: 49-68.
- MATSUMO, M. & MORI, A. (1976): Effects of guanidino compounds on rabbit brain microsomal Na^+, K^+ -ATPase activity. **J. Neurochem.** 27: 635-636.
- MCGAUGH, J.L. (1966): Time-depended processes in memory storage. **Science** 153:1351-1359.
- MCGAUGH, J.L. (1968): A multi-trace view of memory storage processes. **Accademia Nazionale del Lincei** 109:13-28.
- MCGAUGH, J.L. (2000): A century of consolidation. **Science** 287: 248-251.
- MELLO e SOUZA, T.(2001): Participação do córtex cingulado e do córtex pré-frontal na memória da tarefa de esquivas inibitória em ratos. Tese de doutorado do curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- MENINI, T.; CECI, A.; CACCIA, S.; GARATTINI, S.; MASTURZO, P.; SALMONA, M. (1984): Diazepam increases membrane fluidity of rat hippocampus synaptosomes. **FEBS Lett.** 173: 255-258.
- MICHELS, V.V. & BEAUDET, A. (1978): Arginase deficiency in multiple tissues in argininemia. **Clin. Genet.** 13:61-67.
- MIZUTANI, N.; HAYAKAWA, C.; OHYA, Y.; WATANABE, K.; WATANABE, Y.; MORI, A. (1987): Guanidino compounds in hyperargininemia. **J. Exp. Med.** 153: 197-205.
- MIZUTANI, N.; MAEHARA, M.; HAYAKAWA, C.; KATO, T.; WATANABE, K.; SUZUKI, S. (1983): Hyperargininemia: clinical course and treatment with sodium and phenylacetic acid. **Brain Dev.** 5: 555-563.

- MONCADA, C.D.; LEEKIEFFRE, B.; ARVIN, B.; MELDRUM, B. (1992): Effect of NO synthase inhibition on NMDA and ischemia-induced hippocampal lesions. **NeuroReport** 3: 350-532.
- MORENO, J.J. & PRYOR, W.A. (1995): Inactivation of l-proteinase inhibitor by peroxyntirite. **Chem. Res. Toxicol.** 5:425-431.
- MORI, A. (1987): Biochemistry and neurotoxicity of guanidino compounds. History and recent advances. **Pavlovian J. Biol. Sci.** 22: 85-94.
- MORI, A. (1996): Reactive oxygen species and mechanism of induction of seizure by guanidino compounds. In: PARKER, L.; HIRAMATSU, M.; YOSHIKAWA, T. eds. **Free Radicals in Brain Physiology and Disorders.** Academic Press Inc., 3-15.
- MORI, M.; GOTOH, T.; NAGASAKI, A.; TAKIGUCHI, M.; SONOKI, T. (1998): Regulation of the urea cycle enzyme genes in nitric oxide synthesis. **J. Inher. Metab. Dis.** 21(1):59-71.
- MORRIS, R.G.M.; ANDERSON, E.; LYNCH, G.S.; BAUNDRY, M. (1986): Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. **Nature** 297: 681-683.
- NAHAS, T.R. (1999): O teste de campo aberto. In: XAVIER, G.F. ed. **Técnicas para o Estudo do Sistema Nervoso Central.** São Paulo, Editora Plêiade Ltda., 197-215.
- NAYLOR, E.W. & CEDERBAUM, S.D. (1981): Urinary pyrimidine excretion in arginase deficiency. **J. Inherit. Dis.** 4: 207.
- NETTO, C.A.; DIAS, R.D.; IZQUIERDO, I. (1986): Differential effect of post-training naloxone, beta-endorphin, leu-enkephalin and ECS upon memory of an open-field habituation and of a water-finding task. **Psychoneuroendocrinology**, 11: 437-446.
- NUSSLER, A.K.; BILLIAR, T.R.; LIU, Z.Z.; MORRIS, S.M. Jr (1994): Coinduction of nitric oxide synthase and argininosuccinate synthetase in a murine macrophage cell line. Implications for regulation of oxide nitric production. **J. Biol. Chem.** 269: 1257-1261.

- NYHAN, W.L. & HAAS, R. (1997): Inborn Errors of Amino Acid Metabolism and Transport. In: ROSENBERG, R.N.; PRUSINER, S.B.; DIMAURO, S.; BARCHI, R.L. eds. **The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease**. 2nd edn. Newton, Butterworth-Heinemann, 1129-1150.
- O'CONNELL, C. O'MALLEY, A.; REGAN, C.M. (1997): Transient learning-induced ultrastructural changes in spatially-clustered dentate granule cells of the adult rat hippocampus. **Neuroscience** 76: 55-62.
- PALMER, A.M.; FRANCIS, P.T.; BOWEN, D.M.; BENTON, J.S.; NEARY, D.; MANN, D.M.; SNAUDEN, J.S. (1987): Catecholamines neurons assessed ante-mortem in Alzheimer's disease. **Brain Res.** 414:365-375.
- PARIS, F. (2001): Efeitos da gabapentina sobre a memória e ansiedade em ratos e humanos. Tese de mestrado do curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- PERALTA-SERRANO, A. (1965): Argininúria, convulsiones y oligofrenia. Un nuevo error innata del metabolismo? **Rev. Clin. Esp.** 97: 176-184.
- PERLMAN, B.J. & GOLDSTEIN, D.B. (1984): Membrane-disordering potency and anticonvulsant action of valproic acid and other short-chain fatty acids. **Pharmacology** 26: 83-89.
- PEVZNER, L.Z. (1972): The functional biochemistry of neuroglial cells. Leningrad.
- PONTES, Z.E.L.; OLIVEIRA, L.S.; BAVARESCO, C.S.; STRECK, E.L.; DUTRA-FILHO, C.S.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D.; WYSE, A.T.S. (2000): Proline administration decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in the synaptic plasma membrane from cerebral cortex of rats. **Metab. Brain Dis.** 14(4): 265-272.
- QUILLFELDT, J.A. (1994): O papel dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA na expressão da memória no córtex entorrinal e estruturas relacionadas. Tese de doutorado do Departamento de Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- RADI, R.; BECKMAN, J.S.; BUSH, K.M.; FREEMAN, B.A. (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Arch. Biochem. Biophys.** 288: 481-487.
- REGLI, L.; HELD, M.C.; ANDERSON, R.E.; MEYER, F.B. (1994): Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME prevents brain acidosis during focal cerebral ischemia in rabbits. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 16: 988-995.
- ROSE, S.P.R. (1995a): Time-dependent biochemical and cellular processes in memory processes in memory formation. In: MACGAUGH, J.L.; BERMÚDEZ-RATTONI, F.; PRADO-ALCALÁ, R.A. eds. **Plasticity in the Central Nervous System: Learning and Memory**. Mahwah: Erlbaum, 67-82.
- ROSE, S.P.R. (1995b): Cell-adhesion molecules, glucocorticoids and long-term memory formation. **Trends Neurosci.** 18: 502-506.
- RUBIN, M.A.; BOEMO, R.L.; JURACH, A.; ROJAS, D.B.; ZANOLLA, G.R.; OBREGON, A.D.C.; SOUZA, D.O.; MELLO, C.F. (2000): Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. **Behav. Pharmacol.** 11: 57-61.
- SALMON, E.; VAN DER LINDEN, M. COLLETE, F.; DELFIORE, G.; MAQUET, P.; DEGUELDRE, C.; LUXEN, A.; FRANCK, G. (1996): Regional brain activity during working memory tasks. **Brain** 119: 1617-1625.
- SARTI, P.; LENDARO, E.; IPPOLITI, R.; BENEDETTI, P.A.; BRUNORI, M. (1999): Modulation of mitochondrial respiration by nitric oxide: investigation by single cell fluorescence microscopy. **FASEB J.** 13: 191-197.
- SATO, T.; KAMATA, Y.; IRIFUNE, M.; NISHIKAWA, T. (1995): Inhibition of purified (Na⁺,K⁺)-ATPase activity from porcine cerebral cortex by NO generating drugs. **Brain Res.** 704: 117-120.
- SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L., SLY, W.S. AND VALLE, D. eds. (2001): **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, 8th edn., New York, McGraw-Hill.
- SHINDE, U.A.; MEHTA, A.A.; GOYAL, R.K. (2000): Nitric oxide: a molecule of the millennium. **Indian J. Exp. Biol.** 38(3): 201-210.

- SHINDO, S.; TAURUTA, K; YOKOI, I.; MORI, A. (1984): Synthesis of γ -guanidinovaleric acid and its effect on EEG of rats. **Neuroscience** 10: 177-182.
- SHORS, T. & MATZEL, L.D. (1997): Long-term potentiation: what's learning got to do with it? **Behav. Brain Sci.** 20: 597-655.
- SHULL, G.E.; SCHWARTZ, A.; LINGREL, J.B. (1985): Amino-acid sequence of the catalytic subunit of the (Na⁺ + K⁺)ATPase deduced from a complementary DNA. **Nature** 316 (6030): 691-695.
- SHULL, G.E.; LANE, L.K.; LINGREL, J.B. (1986): Amino-acid sequence of the beta-subunit of the (Na⁺ + K⁺)ATPase deduced from a cDNA. **Nature** 321 (6068):429-431.
- SIEGEL, D.J. (2000): Contributions of the psychological sciences. In: KAPLAN & SADOCK'S eds. **Comprehensive Textbook of Psychiatry**, Vol. 1, 7th edn. Philadelphia, Williams & Wilkins, 386-402.
- SILVA, C.G.; PAROLO, E.; STRECK, E.L.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D.; WYSE, A.T.S. (1999): In vitro inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity from rat cerebral cortex by guanidino compounds accumulating in hyperargininemia. **Brain Res.** 838: 78-84.
- SILVA, C.G. (1999): Efeito "in vitro" de substâncias acumuladas na citrulinemia e na argininemia sobre a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase de membrana plasmática sináptica de córtex cerebral de ratos. Tese de mestrado do curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- SKOU, J.C. (1957): The influence of some cations on an adenosin triphosphatase from peripheral nerves. **Biochim. Biophys. Acta.** 23: 394-401.
- SKOU, J.C. (1989): The identification of the sodium-pump as the membrane-bound Na⁺/K⁺-ATPase: a commentary by Jens Chr. Skou. **Biochim. Biophys. Acta.** 1000: 435-438.
- SKOU, J.C. & ESMANN, M. (1992): The Na⁺,K⁺-ATPase. **J. Bioenerg. Biomembr.** 24: 249-261.

- SNYDER, S.H. (1992): Nitric oxide: the first new class of neurotransmitters. **Science** 54: 171.
- SNYDERMAN, S.E.; SANSARIEQ, C; CHEN, W.J.; NORTON, P.M.; PHANSALKER, S.V.(1977): Argininemia. **J. Pediatr.** 90: 563-568.
- SNYDERMAN, S.E.; SANSARIEQ, C; NORTON, P.M.; GOLDSTEIN, F.J. (1979): Argininemia treated from birth. **J. Pediatr.** 95: 61-63.
- SOUTHAM, E.; EAST, S.J.; GARTWAITE, J. (1991): Excitatory amino acid receptors coupled to nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat cerebellum during development. **J. Neurochem.** 56: 2072-2081.
- SPARKES, R.S.; DIZIKES, G.J.; KLISAK, I.; et al (1986): The gene for human liver arginase (AI) is assigned to chromosome band 6q23. **Am. J. Hum. Genet.** 39: 186-193.
- SPECTOR, E.B.; KIERNAN, M.B.; CEDERBAUM, S.D. (1980): Proprieties of fetal and adult red blood cell arginase: a possible diagnostic test for arginase deficiency. **Am. J. Hum. Genet.** 32: 79-87.
- SPECTOR, E.B.; RICE, S.C.H.; CEDERBAUM, S.D. (1983): Biochemical properties of arginase in human adult and fetal tissues. **Biochem. Med.** 28:165-175.
- SPECTOR, E.B.; JENKINSON, C.P.; GRIGOR, M.R.; KERN, R.M.; CEDERBAUM, S.D. (1994): Subcellular location and differential antibody specificity of arginase in tissue culture and whole animals. **Int. J. Dev. Neurosci.** 12: 337-342.
- SQUIRE, L.R. (1992): Memory and the hippocampus: a synthesis of findings with rats, monkeys and humans. **Psychol. Rev.** 99: 195-221.
- STAHL, W.L. (1984): (Na⁺ + K⁺)-ATPase: function, structure and conformations. **Ann. Neurol.** 16(Suppl): S121-S127.
- STRECK, E.L.; ZUGNO, A.I.; TAGLIARI, B.; FRANZON, R.; WANNMACHER, C.M.D.; WAJNER, M.; WYSE, A.T.S. (2001): Inhibition of rat brain Na⁺,K⁺ATPase activity induced by homocysteine is probably mediated by oxidative stress. **Brain Res.** *In press.*

- STRYER, L. (1996): Degradação de aminoácidos e ciclo da uréia. In: **Bioquímica**, 4 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 597-617.
- SWEADNER, K.J. (1991): The sodium pump: recent developments. In: KAPLAN, J.H.; DE WEER, P. eds. **Society of General Physiologists Series**, Vol. 46 (Part I). Rockefeller University Press, New York, 63-76.
- TAKIGUCHI, M.; HARAGUCHI, Y.; MORI, M. (1988): Human liver-type arginase gene: structure and gene analysis of the promotor region. **Nucleic Acids Res.** 16: 8789-8802.
- TERHEGGEN, H.G.; SCHWENK, A.; LOWENTHAL, A.; VAN SANDE, M.; COLOMBO, J.P. (1969): Argininemia with arginase deficiency. **Lancet** 2: 748-749.
- TERHEGGEN, H.G.; SCHWENK, A.; LOWENTHAL, A.; VAN SANDE, M.; COLOMBO, J.P. (1970): Hyperargininämie mit Arginasedefekt. Eine neue familiäre stoffwechselstörung. I. klinische Befunde. **Z. Kinderheilk.** 107: 298-312.
- TERHEGGEN, H.G.; LOWENTHAL, A.; COLOMBO, J.P. (1982): Clinical and biochemical findings in argininemia. In: LOWENTHAL, A.; MORI, A.; MARESCAU, B. eds. Urea Cycle Disease – **Adv. Exper. Med. Biol.** 153: 111-119.
- THIEL, C.M.; HUSTON, J.P.; SCHWARTING, R.J.K. (1998): Hippocampal acetylcholine and habituation learning. **Neuroscience** 85: 1253-1262.
- THOMAS, R.C. (1972): Electrogenic sodium pump in nerve and muscle. **Physiol. Rev.** 52: 563-594.
- TORII, N.; MAMISHITA, T.; OTSU, T.; et al (1995): An inhibitor of calcineurin, FK506, blocks induction of long-term depression in rat visual cortex. **Neurosci. Lett.** 185: 1-4.
- TSAKIRIS, S.; ANGELOGIANNI, P.; SCHULPIS, K.H.; BEHRAKIS, P. (2000): Protective effect of l-cysteine and glutathione on rat brain Na⁺, K⁺-ATPase inhibition induced by free radicals. **Z. Naturforsch.** 55c: 271-277.

- VAZDARJANOVA, A. & MCGAUGH, J.L. (1999a): Basolateral amygdala is involved in modulating consolidation of memory for fear conditioning. **J. Neurosci.** 19: 6615-6622.
- VAZDARJANOVA, A. & MCGAUGH, J.L. (1999b): Basolateral amygdala is not critical for cognitive memory of contextual fear conditioning. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 95: 15003-15007.
- VIANNA, M.R.M.; ALONSO, M.; VIOLA, H.; QUEVEDO, J.; PARIS, F.; FURMAN, M.; STEIN, M.L.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. (2000): Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. **Learn Mem.** 7: 333-340.
- VOET, D. & VOET, J.G. (1995): Amino acid metabolism. In: **Biochemistry**, 2nd edn. New York, John Wiley & Sons Inc., 727-784.
- WESTERINK, B.H.C.; DAMSMA, G.; VRIES, J.B. (1989): Effect of ouabain applied by intrastriatal microdialysis on the in vivo release of dopamine, acetylcholine, and amino acids in the brain of conscious rats. **J. Neurochem.** 52: 705-712.
- WHELLER, K.P.; WALKER, J.A.; BARKER, D.M. (1975): Lipid requirement of membrane sodium-plus-potassium ion-dependent adenosine triphosphatase system, **Biochem. J.** 146: 713-722.
- WIECHERT, P.; MORTELMANS, J.; LAVINHA, F.; CLARA, R.; TERHEGGEN, H.G.; LOWRENTHAL, A. (1976): Excretion of guanidino-derivatives in urine of hyperargininemic patients. **J. Hum. Genet.** 24: 61.
- WOLFMAN, C.; FIN, C.; DIAS, M.; BIANCHIN, M.; Da SILVA, R.C.; SCHMITZ, P.K.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. (1994): Intrahippocampal or intra-amygdala infusion of Kn62, a specific inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, causes retrograde amnesia in the rat. **Behav. Neural. Biol.** 61.
- WOO, A.L.; JAMES, P.F.; LINGREL, J.B. (1999): Characterization of the fourth alpha isoform of the Na⁺,K⁺-ATPase. **J. Membr. Biol.** 169(1):39-44.

- WOO, A.L.; JAMES, P.F.; LINGREL, J.B. (2000): Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na⁺,K⁺-ATPase. **J. Biol. Chem.** 275(27):20693-20699.
- WYSE, A.T.S.(1995): A atividade da Na⁺,K⁺-ATPase de membrana plasmática sináptica de cortex cerebral de ratos na fenilcetonúria experimental. Tese de doutorado do curso de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.
- WYSE, A.T.S.; BOLOGNESI, G.; BRUSQUE, A.M. et al (1995a): Na⁺,K⁺-ATPase activity in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats subjected to chemically induced phenylketonuria. **Med. Sci. Res.** 23: 261-262.
- WYSE, A.T.S.; WAJNER, M.; BRUSQUE, A.M. et al (1995b): Alanine reverses the inhibitory effect of phenylketonuria and its metabolites on Na⁺,K⁺-ATPase in synaptic plasma membrane from cerebral cortex of rats. **Biochem. Soc. T.** 23: 227S.
- WYSE, A.T.S.; NORILER, M.E.; BORGES, L.F.; FLORIANO, P.J.; SILVA, C.G.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M. (1999): Alanine prevents the decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity in experimental phenylketonuria. **Metab. Brain Dis.**14(2):95-101.
- WYSE, A.T.S.; STRECK; E.L.; WORM, P.; WAJNER, A.; RITTER, F.; NETTO C.A.(2000): Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity after brain ischemia. **Neurochem. Res.** 25(7):971-5.
- WYSE, A.T.S.; BAVARESCO, C.S.; BANDINELLI, C.; STRECK, E.L.; FRANZON, R.; DUTRA-FILHO, C.S.; WAJNER, M. (2001): Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME prevents the decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity in midbrain of rats subjected to arginine administration. **Neurochem. Res.** 26: 515-520.
- YOKOI, I.; TOMA, J.; MORI, A. (1984): The effect of homoarginine on the EEG of rats. **Neurochem. Pathol.** 2: 295-300.
- ZAMECKA, E. & POREMBSKA, Z. (1988): Five forms of arginase in human tissues. **Biochem. Med. Metabol. Biol.** 39:258-266.

- ZHOU, Y.; GOPALKRISHNAN, V.; RICHARDSON, J.S. (1997): Actions of neurotoxic β -amyloid on calcium homeostasis and viability of PC12 cells are blocked by antioxidant but not by calcium channel antagonists. **J. Neurochem.** 67(4): 1419-1425.
- ZHU, X.O.; MCCABE, B.J. AGGLETON, J.P.; BROWN, M.W. (1997): Differential activation of the rat hippocampus and perirhinal cortex by novel visual stimuli and a novel environment. **Neurosci. Lett.** 229: 141-143.
- ZOLA-MORGAN, S.; SQUIRE, L.R.; CLOWER, R.P.; REMPEL, N.L. (1993): Damage to the perirhinal cortex exacerbates memory impairment following lesions to the hippocampal formation. **J. Neurosci.** 13: 251-265.
- ZORUMSKI, C.F. & IGUMI, Y. (1993): Nitric oxide and hippocampal synaptic plasticity. **Biochem. Pharmacol.** 46: 777.

6. Anexos

