

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ARGININA SOBRE O METABOLISMO
ENERGÉTICO EM CÉREBRO DE RATOS ADULTOS**

DÉBORA DELWING

ORIENTADORA

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

CO-ORIENTADOR

Prof. Dr. Moacir Wajner

Dissertação apresentada ao Programa 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, 2003

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

“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão.

É preciso, antes de mais nada, querer.”

(Amyr Klink)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e amiga, Profa. Dra. Angela T. S. Wyse pela oportunidade, presença constante, paciência, compreensão, ensinamentos, conselhos e pelo carinho com que orientou este trabalho; e principalmente, pelos “bons fluidos”.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Moacir Wajner pela colaboração, atenção e ensinamentos.

Aos Profs. Clóvis M. D. Wannmacher e Carlos S. Dutra-Filho pelos ensinamentos e amizade.

Aos bolsistas e colegas alunos de pós-graduação pela amizade, apoio, colaboração na realização deste trabalho e também pela alegria e companheirismo nos congressos.

Aos meus pais, Ciro e Dalila, pelo amor, compreensão, carinho e por me incentivarem em todos os momentos, acreditando nos meus sonhos.

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

À minha irmã Daniela por estar ao meu lado em mais um passo de minha vida; pelo incentivo, confidências, amizade, companheirismo e vontade de vencer.

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

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

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

RESUMO

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

O óxido nítrico (NO) é gerado em todas as células do sistema nervoso central (SNC) pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual, na presença de oxigênio molecular, tetraidrobiopterina e outros cofatores, catalisa a conversão de Arg em NO e citrulina. Em condições normais, o NO desempenha importante papel fisiológico no SNC, como por exemplo, na liberação de neurotransmissores e expressão gênica. Quando há formação excessiva, o NO torna-se um importante mediador de neurotoxicidade.

Trabalhos realizados em nosso laboratório mostraram que a administração aguda de Arg em ratos diminui a atividade da Na^+, K^+ -ATPase e aumenta o estresse oxidativo cerebral. Outros estudos mostraram que a administração de Arg prejudica a memória em ratos. Estes resultados foram prevenidos pelo N^{G} -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), um inibidor competitivo da NOS, sugerindo que a administração de Arg altera estes parâmetros através do NO e/ou estresse oxidativo.

Considerando que a administração de Arg aumenta o estresse oxidativo e que estudos mostram que o NO inibe a cadeia de transporte de elétrons provavelmente comprometendo a produção de energia, no presente trabalho, nós investigamos o

efeito da administração aguda de Arg sobre alguns parâmetros do metabolismo energético (produção de CO₂, captação de glicose, produção de lactato e atividades da succinato desidrogenase, complexo II e IV da cadeia respiratória) em hipocampo de ratos. Também testamos o efeito do L-NAME sobre os efeitos produzidos pela Arg.

Ratos adultos de 60 dias foram tratados com uma única injeção intraperitoneal de Arg, de acordo com o protocolo estabelecido por Buchmann e colaboradores (1996). A dose de Arg (0,8 g/Kg) usada atinge níveis plasmáticos semelhantes àqueles encontrados em pacientes hiperargininêmicos (1,5 mM).

Os resultados do presente trabalho mostraram que a administração de Arg aumentou significativamente a produção de lactato e diminuiu a produção de CO₂ e a captação de glicose, bem como as atividades da succinato desidrogenase e do complexo II, e que a injeção simultânea de L-NAME preveniu estes efeitos, exceto a produção de CO₂ e a produção de lactato. No entanto, não houve alteração na atividade da citocromo c oxidase (complexo IV).

Se estes achados também ocorrerem em humanos, pode-se presumir que a Arg prejudica o metabolismo energético, possivelmente através da geração de radicais livres induzida pela formação de NO e/ou da formação de poliaminas, contribuindo assim para a disfunção cerebral observada na hiperargininemia.

ABSTRACT

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

Nitric oxide (NO) is generated in the central nervous system (CNS) by nitric oxide synthase (NOS), which, in the presence of molecular oxygen, tetrahydrobiopterin and other cofactors, catalyses the conversion of Arg to NO and citrulline. NO appears to have a number of important physiological roles within the CNS under normal conditions, including neurotransmitter release, gene expression, pain perception, synaptic plasticity and learning. Under conditions of excessive formation, NO can be an important mediator of neurotoxicity.

We have previously demonstrated that rats subjected to Arg acute administration decreases the activity of Na^+, K^+ -ATPase and increases oxidative stress in brain. On the other hand, we also have reported that Arg administration impairs memory in rats. These findings were prevented by N^ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a competitive inhibitor of NOS, suggesting that Arg administration alters these parameters through NO and/or oxidative stress.

Considering that Arg administration increases oxidative stress and that studies showed that NO inhibits the electron transport chain probably compromising energy production, in the presented study, we investigated the effect of Arg administration to

adult Wistar rats on some parameters of energy metabolism (CO₂ production, glucose uptake, lactate release and the activities of succinate dehydrogenase, complexes II and IV of the respiratory chain) in rat hippocampus. We also tested the effect of L-NAME on the effects produced by Arg.

Sixty-day-old rats were treated with a single intraperitoneal injection of Arg. The Arg dose (0.8 g/Kg) was chosen to produce plasma Arg levels similar to those found in hyperargininemic patients (1,5 mM) according to the protocol established by Buchmann et al. (1996).

The results of the present study showed that Arg administration significantly increased lactate release and diminished CO₂ production and glucose uptake, as well as succinate dehydrogenase and complex II activities, and the simultaneous injection of L-NAME, prevented these effects, except CO₂ production and lactate release. Furthermore, cytochrome c oxidase (complex IV) activity was not changed.

If these findings also occur in the human condition, it may be presumed that Arg impairs energy metabolism, possibly through free radical generation induced by NO formation and/or polyamines formation, contributing to the brain dysfunction observed in hyperargininemia.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Erros Inatos do Metabolismo	01
1.2 Ciclo da uréia	04
1.2.1 Erros inatos do ciclo da uréia.....	09
1.2.1.1 Conceito e freqüência.....	09
1.2.1.2 Aspectos clínicos gerais.....	10
1.3 Argininemia ou Hiperargininemia	11
1.3.1 Conceito.....	11
1.3.2 Metabolismo da arginina e arginase.....	11
1.3.3 Aspectos clínicos.....	15
1.3.4 Aspectos fisiopatológicos.....	16
1.3.5 Diagnóstico.....	17
1.3.6 Tratamento.....	18
1.3.7 Óxido nítrico.....	20
1.4 Modelo animal de hiperargininemia	22
1.5 Metabolismo energético	23
1.5.1 Destinos da glicose e ciclo do ácido cítrico.....	24
1.5.2 Cadeia Respiratória Mitocondrial.....	26
1.5.3 Metabolismo energético e óxido nítrico	31
2 OBJETIVOS	33
3 ARTIGO	34

4 DISCUSSÃO.....	35
5 CONCLUSÕES.....	42
6 ANEXO.....	43
7 PERSPECTIVAS.....	48
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação esquemática do ciclo da uréia.....	07
FIGURA 2. Representação esquemática da reação geral do ciclo da uréia.....	08
FIGURA 3. Conversão de arginina em uréia e ornitina.....	11
FIGURA 4. Vias catabólicas para arginina em pacientes hiperargininêmicos.....	14
FIGURA 5. Reação entre óxido nítrico e ânion superóxido, formando ânion peroxinitrito, ácido peroxinítrico e nitrato.....	21
FIGURA 6. Destinos da glicose.....	25
FIGURA 7. Ciclo do ácido cítrico.....	26
FIGURA 8. Fluxo de elétrons através dos quatro complexos da cadeia respiratória....	31

LISTA DE ABREVEATURAS

AI: arginase I

All: arginase II

AcetilCoA: acetil coenzima A

ADP: adenosina 5'-difosfato

AL: arginossuccinato liase

AMP: adenosina 5'-monofosfato

Arg: arginina

ArgA: ácido arginínico

AS: arginossuccinato sintase

ATP: adenosina 5'- trifosfato

CoQ: coenzima Q

COX: citocromo c oxidase

CO₂: gás carbônico

CP: carbamil fosfato

CPS: carbamil fosfato sintase

CR: cadeia respiratória

Cu²⁺ : íon cúprico

EI: erros inatos

EIM: erros inatos do metabolismo

e NOS: óxido nítrico sintase endotelial

FAD: flavina adenina dinucleotídeo (forma oxidada)

FADH₂ : flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

Fe²⁺ : íon ferroso

Fe³⁺ : íon férrico

Fe – S: centros ferro - enxofre

FMN: flavina mononucleotídeo

GAA: ácido guanidinoacético

GBA: ácido G-guanidinobutírico

GTP: guanosina trifosfato
GVA: ácidos α -ceto- γ -guanidinovalérico
HArg: homoarginina
H₂O: água
i NOS: óxido nítrico sintase induzida
L-NAME: N^ω-nitro-L-arginine methyl ester
NAArg: N- α -acetilarginina
NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH. H⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NMDA: N-metil-D-aspartato
n NOS: óxido nítrico sintase neuronal
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintase
ONOO⁻: ânion peroxinitrito
OTC: ornitina transcarbamilase
O₂: oxigênio molecular
O₂⁻: ânion superóxido
Pi: pirofosfato
PPi: pirofosfato inorgânico
SNC: sistema nervoso central

1 INTRODUÇÃO

1.1 Erros inatos do metabolismo

O termo “erro inato do metabolismo” foi sugerido em 1908 por Garrod, a fim de caracterizar quatro situações que o mesmo estudava, a alcaptonúria, o albinismo, a pentosúria e a cistinúria (Stambury et al., 1983).

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

Segundo Stambury e colaboradores (1983), todos os processos bioquímicos no organismo estão sob controle gênico, portanto, sujeitos a serem realizados de forma deficiente, sempre que uma mutação gênica se manifestar.

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

O vasto número de defeitos envolvidos resulta em quadros clínicos extremamente diversos; enquanto alguns EIM são absolutamente assintomáticos, outros são tão graves que resultam em morte neonatal. O mecanismo pelo qual os EIM provocam sintomas clínicos é muito variado. O grande número de EIM, a diversidade dos defeitos

metabólicos envolvidos e a ausência, na maioria dos casos, de sinais e sintomas específicos contribuem para dificultar o diagnóstico dessas doenças (Giugliani, 1988).

No grupo de EIM há um razoável número de defeitos que podem se beneficiar de um tratamento específico, sendo que, de uma maneira geral, o tratamento é tanto mais bem sucedido quanto mais precoce é o diagnóstico (Giugliani, 1988).

Os EIM podem ser abordados terapêuticamente de diversas maneiras, entre elas:

- limitando a entrada do precursor (o acúmulo de determinado aminoácido pode ser controlado pelo uso de uma dieta pobre neste composto);
- suplementando o metabólito ausente (como exemplo, no hipotireoidismo, onde se administra tiroxina);
- inibindo a formação da substância acumulada (como no caso da gota, onde se administra alopurinol, o qual inibe a enzima xantina oxidase, diminuindo a formação de ácido úrico);
- inibindo o acúmulo de uma determinada substância (é o caso da doença de Wilson, onde a deficiência de ceruloplasmina causa acúmulo de cobre nos tecidos, o que pode ser inibido pelo uso de drogas que se ligam ao cobre, impedindo, assim, o depósito de cobre);
- controlando os fatores desencadeantes (como exemplo na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, onde deve-se evitar o uso de fármacos que causam hemólise);
- aumentando a atividade enzimática pela suplementação do cofator (como exemplo, na homocistinúria, onde se administra piridoxina, a qual torna a enzima mais ativa);

- suplementando a proteína não enzimática deficiente (como na hemofilia, onde se administra o fator VIII); e
- suplementando a enzima deficiente (seria o tratamento ideal para a maioria dos EIM, mas apresenta inúmeras dificuldades) (Stambury et al., 1983).

Abaixo se encontra descrita a classificação dos EIM conforme a área do metabolismo afetado.

EIM dos aminoácidos

EIM dos ácidos orgânicos

EIM dos carboidratos

EIM dos lipídios

EIM dos glicosaminoglicanos

EIM das glicoproteínas

EIM das purinas e pirimidinas

EIM das enzimas eritrocitárias

EIM dos metais

EIM das lipoproteínas

EIM dos hormônios

Embora individualmente raros, os EIM são relativamente freqüentes em seu conjunto, estimando-se que possam ocorrer em até 1 em cada 1000 recém-nascidos (Giugliani, 1988).

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

A hiperargininemia corresponde a um erro inato (EI) do ciclo da uréia, ocasionado por um defeito enzimático neste ciclo, no qual a concentração dos aminoácidos que estão situados antes do defeito encontra-se aumentada, e a concentração daqueles que se situam depois do defeito encontra-se diminuída (Feillet e Leonard, 1998).

A alta prevalência de EIM na população justifica a preocupação científica em busca da detecção e possível tratamento.

1.2 Ciclo da uréia

Os aminoácidos, derivados principalmente das proteínas da alimentação ou da degradação das proteínas intracelulares, são a última classe de biomoléculas, cuja oxidação contribui significativamente para a geração de energia metabólica. O valor da fração de energia metabólica derivada dos aminoácidos varia com o tipo de organismo considerado e com a situação metabólica em que ele se encontra (Lehninger et al., 2001).

As vias de degradação dos aminoácidos são muito similares na maioria dos organismos. Os esqueletos carbônicos dos aminoácidos, em geral, seguem para o ciclo do ácido cítrico ou para a gliconeogênese (Lehninger et al., 2001). Já o grupamento amino, liberado na forma de amônia, é em parte consumido na

biossíntese de compostos nitrogenados e o excesso é convertido em uréia pelo ciclo da uréia (Stryer et al., 1996), sendo levada, pela circulação sanguínea, para os rins onde é facilmente excretada através da urina (Lehninger et al., 2001).

Em aves e répteis terrestres a amônia é convertida em ácido úrico para excreção, enquanto que em alguns animais aquáticos a própria amônia é excretada (Stryer et al., 1996).

Em 1932, Hans Krebs e Kurt Henseleit elucidaram uma série de reações, as quais compunham o ciclo da uréia. O ciclo da uréia foi a primeira via metabólica cíclica a ser caracterizada (Stryer et al., 1996).

O ciclo da uréia consiste de cinco reações enzimáticas. As etapas do ciclo são descritas a seguir e mostradas abaixo, na figura 1. A carbamil fosfato sintase (CPS), uma enzima de matriz mitocondrial, catalisa a biossíntese de carbamil fosfato (CP), a partir da condensação e ativação de amônio e bicarbonato e subsequente hidrólise de duas moléculas de ATP. N-acetilglutamato é um cofator alostérico da CPS e um importante regulador da ureagênese. A ornitina transcarbamilase (OTC), também uma enzima de matriz mitocondrial, catalisa a biossíntese de citrulina a partir de ornitina e CP. A citrulina é transportada para o citosol, onde é condensada com aspartato via arginossuccinato sintase (AS) para formar arginossuccinato, impelida pela clivagem de ATP a AMP e pirofosfato inorgânico (PPi) e subsequente hidrólise do PPi. O arginossuccinato é clivado em arginina (Arg) e fumarato pela arginossuccinato liase (AL). A Arg é subsequentemente hidrolisada pela arginase em uréia e ornitina, que, por sua vez, é transportada para o interior da mitocôndria via sistema de transporte

específico, para novamente ser transcarbamilada a citrulina (Voet et al., 2000; Brusilow e Horwich, 2001).

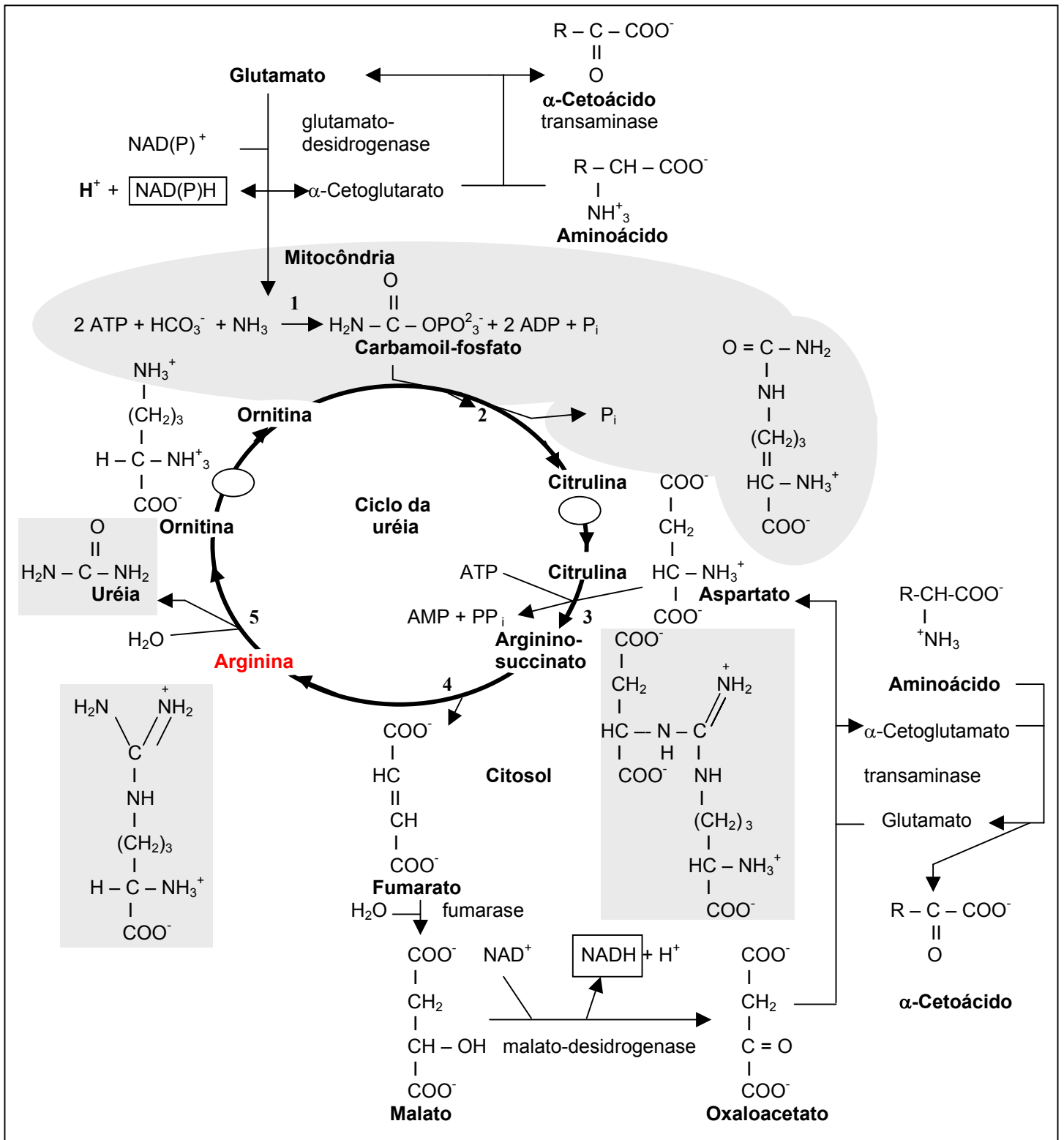


Figura 1. Representação esquemática do ciclo da uréia. O ciclo da uréia ocorre parcialmente na mitocôndria e, em parte, no citosol com ornitina e citrulina sendo transportados através da membrana mitocondrial por sistemas transportadores específicos. Cinco enzimas participam do processo: 1. CPS, 2. OTC, 3. AS, 4. AL, 5. Arginase (Adaptado de Voet et al., 2000).

Assim, os dois átomos de nitrogênio da uréia provêm da amônia e do aspartato, ao passo que o átomo de carbono é proveniente do bicarbonato. A síntese da uréia ocorre com o custo de quatro ligações fosfato de alta energia, 3 ATP, os quais são hidrolisados em 2 ADP, 2 Pi, AMP e PPi, seguido da hidrólise do PPi.

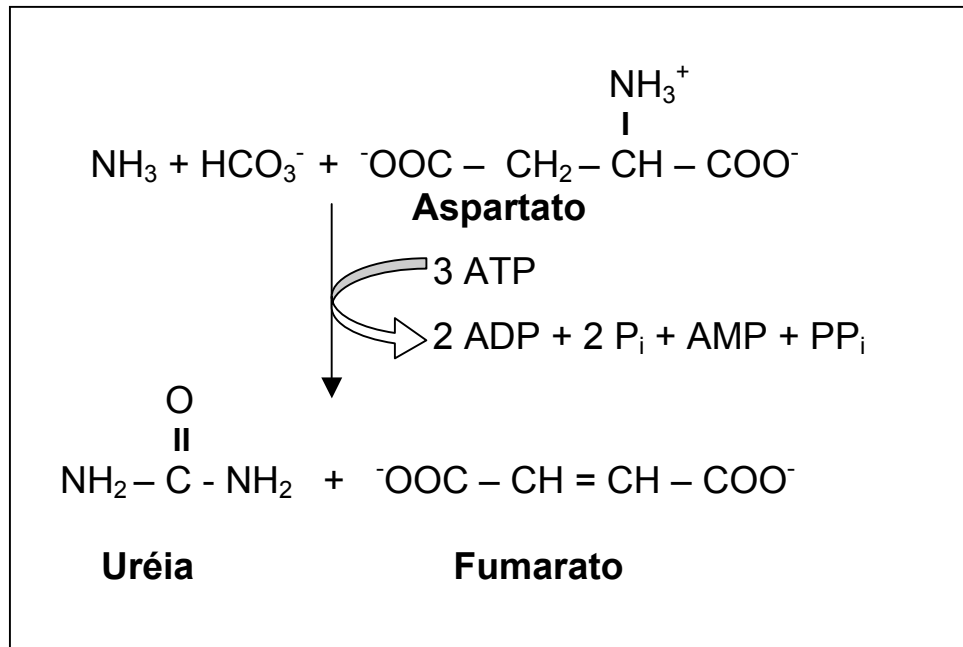


Figura 2. Representação esquemática da reação geral do ciclo da uréia (Adaptado de Voet et al., 2000).

A CPS, enzima que catalisa o primeiro passo do ciclo da uréia, tem como efetor alostérico positivo o N-acetilglutamato, o qual é sintetizado a partir de glutamato e de acetil coenzima A (acetil CoA) pela N-acetilglutamato sintase. Quando as taxas de quebra de aminoácido aumentam, a concentração de glutamato aumenta como resultado da transaminação. O aumento de glutamato estimula a síntese de N-acetilglutamato (Voet et al., 2000).

As demais enzimas do ciclo da uréia são reguladas pelas concentrações de seus substratos (Voet et al., 2000).

Sugere-se que a velocidade de entrada de ornitina na mitocôndria seja também um fator limitante para a síntese de citrulina (Brusilow e Horwich, 2001).

1.2.1 Erros inatos do ciclo da uréia

1.2.1.1 Conceito e freqüência

As doenças conhecidas como EI do ciclo da uréia eram consideradas, há algumas décadas atrás, doenças raras e que ocorriam principalmente em neonatos. Contudo, após vinte anos de pesquisas realizadas em centros de referência, verificou-se que estas doenças também podem ocorrer em idades mais avançadas e de forma mais comum do que previamente imaginava-se (Brusilow e Horwich, 2001).

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

1.2.1.2 Aspectos clínicos gerais

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

O quadro clínico mais grave destas quatro doenças ocorre em crianças sem nenhum fator de risco obstétrico e que aparentemente são normais nas primeiras 24 a 48 horas de vida, podendo posteriormente apresentar 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 e Horwich, 2001).

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

1.3 Argininemia ou Hiperargininemia

1.3.1 Conceito

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

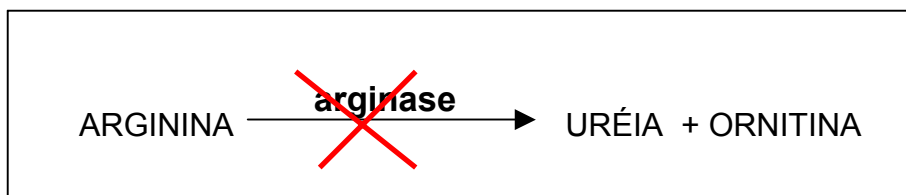


Figura 3. Conversão de arginina em uréia e ornitina.

1.3.2 Metabolismo da arginina e arginase

Alguns autores classificam a Arg como um aminoácido “semi-essencial”. Esta classificação deve-se ao fato de que a Arg precisa ser obtida através da dieta como suplemento para a síntese endógena durante o período de crescimento e em adultos doentes (trauma, insuficiência renal, lesões por queimaduras). No entanto, em adultos saudáveis, a síntese endógena de Arg é satisfatória (Barbul, 1995; Wakabayashi, 1995; Flynn et al., 2002; Tapiero et al., 2002). Por outro lado, Brusilow e Horwich

(2001), classificam a Arg como um aminoácido não essencial, exceto em pacientes com defeitos no ciclo da uréia (deficiência de CPS, OTC, AS e AL).

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

A arginase está presente em altas concentrações no fígado, mas encontra-se também em outros tecidos. O fígado é o único órgão que contém todas as enzimas do ciclo da uréia e caracteriza-se por ser o órgão em que ocorre a ureagênese (Brusilow e Horwich, 1995; Jenkinson et al., 1996).

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

A descoberta da isoforma A II ocorreu em um estudo feito em 1979 com dois irmãos que apresentavam a deficiência de AI. A ingesta protéica destas crianças foi aumentada gradativamente e as concentrações plasmáticas dos aminoácidos do ciclo da uréia e outros relacionados foram dosadas, além da excreção de uréia. Os resultados mostraram que ao triplicar a ingesta protéica, dobra-se a concentração de uréia na urina (Cederbaum et al., 1979). Este resultado, quando comparado a 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 e Knox, 1973; Kaysen e Strecker, 1973).

Posteriormente, Spector e colaboradores (1983) demonstraram que, em indivíduos com deficiência na atividade da enzima de arginase em fígado e eritrócitos, a atividade da arginase renal encontra-se 3 vezes maior do que o normal.

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

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

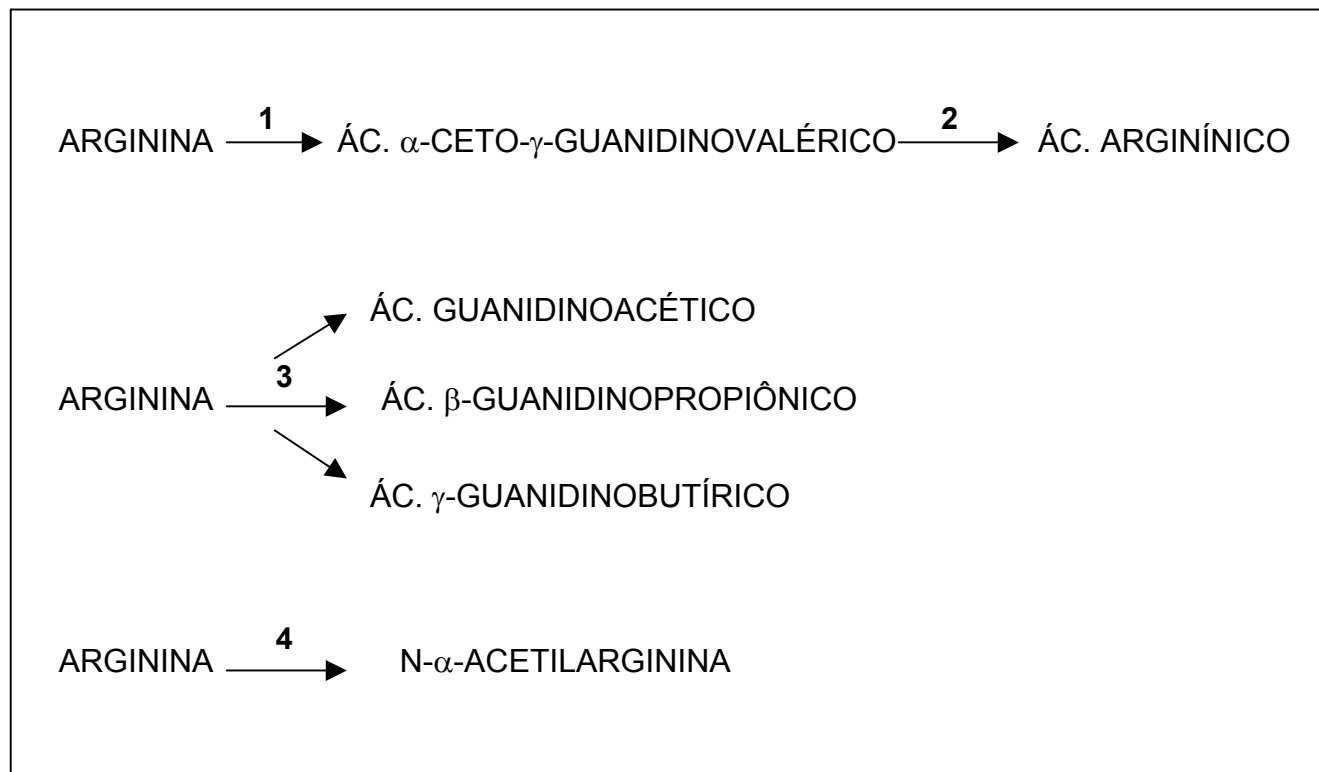


Figura 4. Vias catabólicas para arginina em pacientes hiperargininêmicos. 1- Transaminação; 2- Hidrogenação; 3- Transamidinação; 4- Acetilação (Adaptado de Marescau et al., 1990).

A literatura relata um experimento em que a dosagem de 29 amostras de plasma de pacientes hiperargininêmicos mostrou um aumento nos níveis plasmáticos de homoarginina (HArg), GVA, ArgA, NAAArg (Cederbaum et al., 1977). As concentrações destes compostos podem atingir valores de 5 à 50 vezes os normais, tanto em plasma como em líquido (Mizutani et al., 1987).

Por outro lado, a Arg também é o substrato para a síntese de óxido nítrico (NO). Este é gerado em todas as células do sistema nervoso central (SNC) pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual, na presença de oxigênio molecular (O_2), tetraidrobiopterina, flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo

(FMN), catalisa a conversão de Arg em NO e citrulina (Lincoln et al., 1997; Law et al., 2001). A Arg parece ser o único substrato fisiológico para a síntese de NO em células eucarióticas. Por outro lado, análogos da Arg são inibidores potentes de NOS (Grant et al., 1998).

NOS foi primeiramente identificada no cérebro e, subsequentemente, em macrófagos e células endoteliais. Há pelo menos três isoformas de NOS: a constitutiva endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS), e a isoforma induzida (iNOS). As isoformas localizadas em células endoteliais e em neurônios estão presentes em condições normais e são dependentes de cálcio; enquanto a isoforma induzida (macrófagos) está presente quando há ativação por endotoxinas e citocinas, não sendo cálcio dependente (Bredt e Snyder, 1990; Pollock et al., 1991; Stuehr et al., 1991; Lacza et al., 2001).

1.3.3 Aspectos clínicos

Pacientes hiperargininêmicos apresentam uma síndrome neurológica que consiste de um grau variado de retardo mental e psicomotor, epilepsia, severa espasticidade (com os membros inferiores afetados mais severamente que os membros superiores), hiperatividade e perda progressiva da capacidade motora e mental (Snyderman et al., 1977; Cederbaum et al., 1979; Marescau et al., 1992; De Deyn et al., 1997). Os pacientes podem apresentar episódios intermitentes de vômito, irritabilidade, letargia e coma. Estes sintomas poderão também ser observados em outros EI do ciclo da uréia (Colombo, 1992). Porém, um sinal bastante peculiar desta

doença é a espasticidade progressiva, que não é observada nas demais doenças do ciclo da uréia, sendo, portanto, característica da hiperargininemia (Marescau et al., 1990).

A maioria das crianças apresenta-se clinicamente normal ao nascimento. 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 a hiperamonemia (Colombo, 1992).

1.3.4 Aspectos fisiopatológicos

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

A hiperamonemia parece ser a causa do dano causado ao SNC de pacientes com enzimopatias do ciclo da uréia. No entanto, em pacientes hiperargininêmicos, a hiperamonemia observada é intermitente, ao contrário das demais enzimopatias do ciclo da uréia. Portanto, o acúmulo de amônia, não é o único fator responsável pelo dano cerebral observado nesses pacientes. Supõe-se que outros fatores devam contribuir com os sintomas neurológicos característicos de pacientes hiperargininêmicos (Mizutani et al., 1987). Neste contexto, Marescau e colaboradores (1990), propuseram a hipótese de que a Arg, ao invés da amônia, seria neurotóxica

nestas condições. Este fato levou diversos pesquisadores a investigarem o papel da Arg e de seus metabólitos, os compostos guanidínicos, na patogênese desta doença (Marescau et al., 1990; Marescau et al., 1992; De Deyn et al., 1997; Silva et al., 1999).

Também foi sugerido que o excesso de Arg presente na hiperargininemia poderia servir de substrato para a síntese de NO, e que o excesso de produção deste poderia ter um papel na fisiopatologia desta doença (Mori et al., 1998). Entretanto, o(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(is) estes compostos atuam no SNC e o quão responsáveis eles seriam pelo dano neurológico presente na hiperargininemia ainda permanece desconhecido.

1.3.5 Diagnóstico

Primeiramente, a hiperargininemia pode ser bioquimicamente diagnosticada pela dosagem dos altos níveis de Arg existentes nos fluídos biológicos dos pacientes (Cederbaum et al., 1977).

Pode-se também, utilizar como parâmetro bioquímico, a dosagem dos compostos guanidínicos, os quais são catabólitos da Arg, na urina, plasma e líquido. Verificou-se que a excreção urinária de GVA e ArgA estão elevadas em todos os pacientes e que suas concentrações plasmáticas estão aumentadas 10 vezes em relação ao normal. Desta forma, a análise qualitativa e quantitativa destes compostos pode ser usada como um importante parâmetro complementar para o diagnóstico bioquímico da hiperargininemia. Para confirmação do diagnóstico, deve-se determinar a atividade da arginase em eritrócitos (Marescau et al., 1992).

Segundo Spector e colaboradores (1980), as células vermelhas fetais e adultas têm arginase com propriedades idênticas. Assim, enquanto fibroblastos e amniócitos não apresentam atividade da arginase, células vermelhas fetais obtidas por aminioscopia podem ser úteis no diagnóstico pré-natal.

No caso de pacientes hiperargininêmicos não tratados, ocorre também um aumento significativo da excreção urinária de outros aminoácidos dibásicos (ornitina, lisina, citrulina), ácido glutâmico, glutamina e cistina (Yoshino et al., 1982). Por outro lado, os pacientes hiperargininêmicos seguem uma dieta de baixo conteúdo protéico, apresentando assim, níveis urinários de Arg, HArg e GAA normais (Marescau et al., 1992).

1.3.6 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 se apresenta 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).

A restrição protéica foi a primeira medida adotada por pacientes hiperargininêmicos. A redução da ingestão de nitrogênio reduz o fluxo deste através do ciclo da uréia, diminuindo assim, a biossíntese de Arg (Brusilow e Horwich, 2001).

Os primeiros trabalhos publicados, que descreviam apenas o uso de terapia dietética em pacientes com deficiência de arginase, sugeriam que uma aplicação rigorosa deste tratamento poderia reduzir os níveis plasmáticos de Arg para normais ou próximos ao normal, além de diminuir os níveis anormais de aminoácidos no fluido cérebro-espinhal (Snyderman et al., 1979; Cederbaum et al., 1982; De Deyn et al., 1997). 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). Estes estudos sugerem que uma combinação de terapia de restrição protéica juntamente com um suplemento de aminoácidos essenciais com ou sem a administração de benzoato de sódio parece ser eficaz em diminuir os níveis de Arg nos fluidos biológicos (Marescau et al., 1990).

Outra alternativa é a estimulação de rotas alternativas para excreção de amônia. A administração de benzoato de sódio e/ou ácido fenilacético é efetiva em aumentar a excreção de metabólitos nitrogenados não uréicos em pacientes com EI do ciclo da uréia. A administração oral de benzoato de sódio e ácido fenilacético reduz a amônia plasmática por aumentar a excreção de ácido hipúrico e fenil acetil glutamina, respectivamente (Batshaw et al., 1981; Mizutani et al., 1983; Brusilow e Horwich, 2001).

Considerando que a Arg e a lisina utilizam um mesmo sistema de transporte na barreira cérebro-sangue, sugeriu-se que a suplementação de lisina poderia ser uma

terapia efetiva. No entanto, testes em pacientes revelaram que a suplementação com lisina ocasionou aumento nos níveis plasmáticos de Arg, o que leva a conclusão de que essa terapia não é efetiva (Snyderman et al., 1977; Cederbaum et al., 1979).

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

1.3.7 Óxido nítrico

O NO é sintetizado endogenamente pela ação da enzima NOS em tecidos especializados tendo como precursora a L-arginina (Law et al., 2001).

Especula-se que os altos níveis de Arg, encontrados em pacientes hiperargininêmicos, possam resultar em aumento dos níveis cerebrais de NO. Esta suposição foi apoiada pelos achados de Buchmann e colaboradores (1996), onde se verificou aumento nas concentrações de citrulina no cérebro de ratos após a administração aguda de Arg.

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

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

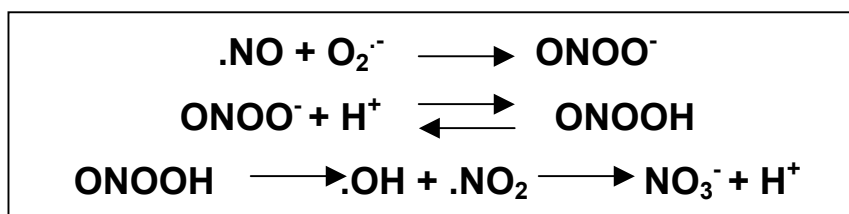


Figura 5. Reação entre óxido nítrico e ânion superóxido, formando ânion peroxinitrito, ácido peroxinítrico e nitrato.

A toxicidade associada à formação do NO pode, em muitos casos, ser prevenida pela remoção do $O_2^{\cdot-}$. A formação do $ONOO^-$ é, portanto, considerada um importante fator responsável pelo dano celular (Lipton et al., 1993).

Estudos realizados em nosso laboratório recentemente mostraram que a administração aguda de Arg aumenta a lipoperoxidação (quimiluminescência) e diminui a capacidade antioxidante total (TRAP) em cérebro de ratos e que a administração de N^{\oplus} -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), um inibidor competitivo

da NOS, previne estes efeitos (Wyse et al., 2001). Estes resultados sugerem que a administração deste aminoácido induz o estresse oxidativo como consequência do aumento na formação de NO e/ou peroxinitrito.

Dados da literatura mostram que a inibição da respiração celular é um importante mecanismo pelo qual o NO exerce efeito citotóxico (Cassina e Radi, 1996). Por outro lado, evidências também mostram que a ativação da NOS, pode estar envolvida na neurotoxicidade do glutamato, via ativação de receptores NMDA (Dawson et al., 1991, 1993a).

1.4 Modelo animal de hiperargininemia

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

A dose de Arg administrada aos ratos foi de 0,8 g/Kg. Dose em que Buchmann e colaboradores (1996) encontraram níveis de Arg plasmáticos e concentrações cerebrais de aproximadamente 1,3 mM e 0,3 nmol/Kg, respectivamente.

Segundo Buchmann e colaboradores (1996), a administração de Arg causa um aumento nas concentrações de citrulina em cérebro de ratos. Este achado sugere que altos níveis de Arg possam resultar em aumento nos níveis cerebrais de NO.

Trabalhos realizados em nosso laboratório, utilizando este modelo de hiperargininemia aguda em ratos mostraram uma redução significativa na atividade da Na^+, K^+ -ATPase cerebral (Wyse et al., 2001) e um déficit de memória em ratos (Reis et al., 2002). No entanto, estas alterações foram prevenidas pela administração de L-NAME.

Wyse e colaboradores (2001) também mostraram que a administração aguda de Arg induziu o estresse oxidativo em cérebro de ratos. Este efeito foi prevenido pela administração simultânea de Arg e L-NAME. Mais recentemente Bavaresco e colaboradores (2003) mostraram que o pré-tratamento com vitaminas E e C preveniu a inibição da Na^+, K^+ -ATPase e o aumento da formação de radicais livres em animais submetidos à administração de Arg.

Outro trabalho realizado em nosso laboratório mostrou que os compostos guanidínicos (NAArg, HArg e ArgA), os quais estão aumentados na hiperargininemia, reduziram em torno de 30 a 40 % a atividade da Na^+, K^+ -ATPase (*in vitro*) de membrana plasmática sináptica de córtex cerebral de ratos (Silva et al., 1999).

1.5 Metabolismo energético

Os seres vivos precisam de energia para realizar várias funções, tais como contração muscular, transporte ativo de íons e moléculas, processos biossintéticos, entre outros. A glicose é o principal combustível para o cérebro humano, exceto durante o jejum prolongado. Este possui pouca reserva energética e, por isso,

necessita de um suprimento contínuo de glicose. Em estado de repouso, o cérebro responde por 60% da utilização de glicose do organismo. Durante a inanição, os corpos cetônicos, substituem parcialmente a glicose como combustível para o cérebro (Stryer, 1996; Nelson e Cox, 2000).

1.5.1 Destinos da glicose e ciclo do ácido cítrico

A glicose é transportada para o interior das células por proteínas transportadoras específicas e pode ser consumida em diferentes vias metabólicas. A glicólise, a qual é uma rota citosólica, consiste na principal via de degradação da glicose. Esta corresponde a uma seqüência de reações que transforma a glicose em piruvato com concomitante produção de ATP. Em condições aeróbicas, o piruvato entra na mitocôndria, sendo completamente oxidado a CO_2 e H_2O . O rendimento energético na conversão de uma molécula de glicose em duas moléculas de piruvato é duas moléculas de ATP. Quando a célula com capacidade de síntese de glicogênio possui altos níveis de ATP, a glicose pode ser armazenada nesta forma. O glicogênio atua como uma reserva energética facilmente mobilizada. Como alternativa, a glicose pode participar da rota das pentoses, com o propósito de gerar NADPH, o qual é usado para biossínteses redutoras (Stryer, 1996; Nelson e Cox, 2000).

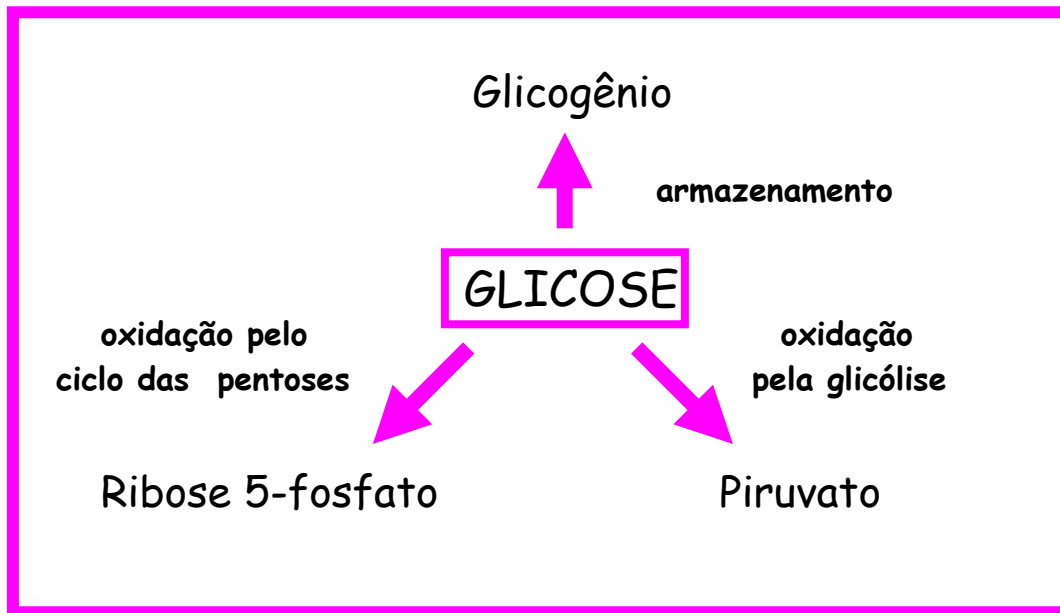


Figura 6. Destinos da glicose.

Quando o suprimento de oxigênio for insuficiente, como é o caso do músculo esquelético em grande atividade contrátil, o piruvato é convertido a lactato, pela enzima lactato desidrogenase, formando ATP e consumindo NADH. H⁺ (Stryer, 1996).

Em condições aeróbicas, a etapa seguinte na produção de energia a partir de glicose é a descarboxilação oxidativa do piruvato para formar acetil CoA. A acetil CoA é conseqüentemente completamente oxidada a CO₂ pelo ciclo do ácido cítrico. Em contraste a glicólise, as reações do ciclo do ácido cítrico ocorrem no interior da mitocôndria. O ciclo do ácido cítrico opera somente em condições aeróbicas, porque requer um suprimento de NAD⁺ e FAD. Em cada volta do ciclo, são formadas três moléculas de NADH. H⁺, uma molécula de FADH₂, duas de CO₂ e uma de GTP. Os carreadores, NAD⁺ e FAD, são regenerados quando o NADH. H⁺ e o FADH₂ transferem seus elétrons ao O₂ através da cadeia de transporte de elétrons, com a

concomitante produção de ATP (Stryer, 1996; Nelson e Cox, 2000). Cabe salientar, que a acetil CoA, também é obtida pela oxidação de outras biomoléculas, como aminoácidos e ácidos graxos (Stryer, 1996).

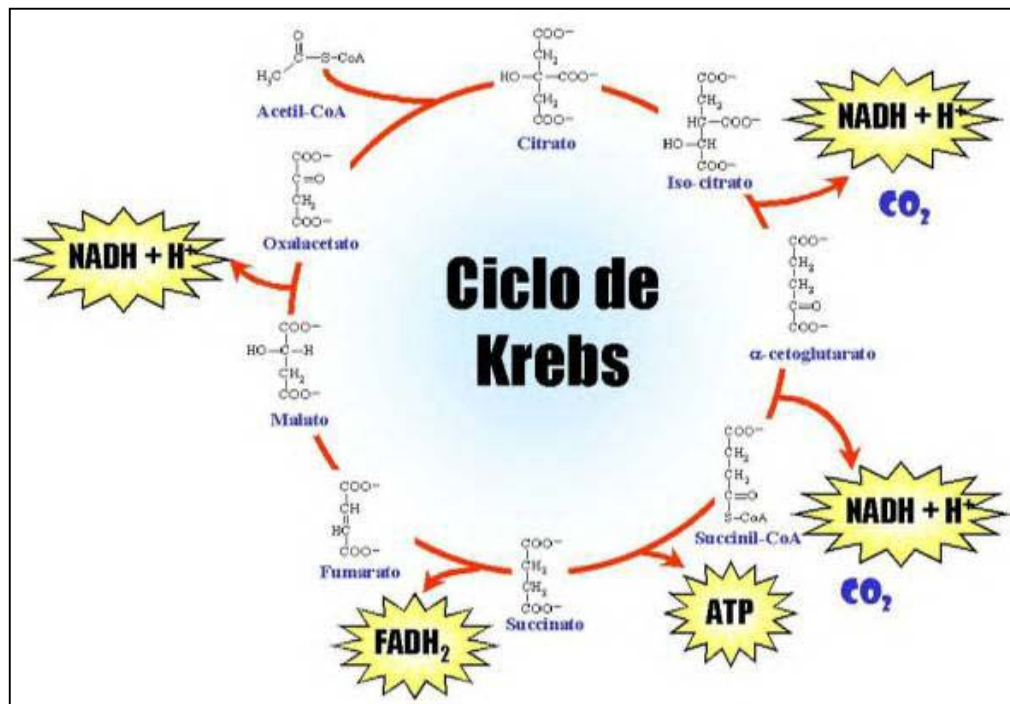


Figura 7. Ciclo do ácido cítrico.

1.5.2 Cadeia Respiratória Mitocondrial

Em diferentes tecidos, a mitocôndria apresenta tamanho, forma e densidade diferente. Cada mitocôndria consiste de uma membrana mitocondrial interna e de uma membrana mitocondrial externa. O espaço entre a membrana interna e externa

chama-se espaço intermembrana. A área cercada pela membrana interna é a matriz, onde ocorre o ciclo do ácido cítrico (Bowling e Beal, 1995).

A maior parte da energia celular é gerada através da fosforilação oxidativa, um processo que requer a ação de vários complexos enzimáticos localizados em uma estrutura especial da membrana mitocondrial interna, a cadeia respiratória (CR) (Di Donato, 1997).

A respiração celular começa com a oxidação de substratos em várias vias metabólicas, acompanhada da transferência de elétrons para o NAD^+ e o FAD , os quais serão reduzidos a NADH , H^+ e FADH_2 , respectivamente (Marks et al., 1996).

Em uma segunda fase, através da CR, os elétrons do NADH , H^+ e do FADH_2 são transferidos através de pares redox fornecendo energia para a síntese de ATP pelo processo de fosforilação oxidativa. Segundo a teoria quimiosmótica, tal energia origina-se do gradiente de prótons gerado através da membrana mitocondrial interna, formado pelo bombeamento de prótons para o espaço entre membrana mitocondrial interna e externa através dos complexos da CR (Marks et al., 1996; Wallace, 1999; Heales et al., 1999).

A CR é uma seqüência de carreadores de elétrons, que em sua maioria são ligados a proteínas inseridas na membrana mitocondrial interna, e que recebem elétrons de compostos reduzidos e os transferem a compostos oxidados, até chegarem a seu aceptor final, o O_2 , formando H_2O (Marks et al., 1996).

Os componentes da cadeia respiratória são os seguintes: NADH , H^+ desidrogenase (complexo I), succinato desidrogenase (complexo II), complexo citocromo b-c₁ (complexo III) e citocromo oxidase (complexo IV). Além desses

complexos, a CR possui dois transportadores móveis de elétrons, que são a coenzima Q (CoQ), entre os complexos I e III, e o citocromo c, entre os complexos III e IV (Lehninger et al., 2001).

NADH. H⁺ DESIDROGENASE (complexo I)

O complexo I contém FMN e centros ferro-enxofre (Fe-S). FMN recebe os elétrons do NADH. H⁺ e é capaz de transferi-los para os centros Fe-S. O NADH. H⁺ é reoxidado a NAD⁺, que retorna ao ciclo do ácido cítrico ou a outra via metabólica a fim de receber elétrons. Os centros Fe-S estão envolvidos na transferência de elétrons para a CoQ e vice-versa (Marks et al., 1996).

COENZIMA Q

Também conhecida como ubiquinona, é o único componente da CR que não é ligado a uma proteína. É capaz de difundir-se através da membrana mitocondrial interna. A oxidação e redução da CoQ e seu movimento intramembrana faz parte do mecanismo de bombeamento de prótons entre o complexo NADH. H⁺ desidrogenase e o complexo b-c₁ (Marks et al., 1996).

COMPLEXO b-c₁ (complexo III) E CITOCCROMO c

Os citocromos são proteínas que contêm um grupo heme (um átomo de ferro ligado a um núcleo porfirina). Os elétrons fluem entre os citocromos sempre no sentido dos citocromos de um menor nível potencial redox e o ferro (que se encontra no estado Fe³⁺). Quando o Fe³⁺ recebe um elétron, é reduzido a Fe²⁺, sendo reoxidado a Fe³⁺ quando transfere o elétron recebido para a CR. Os citocromos b e c₁ formam juntamente com outras proteínas o complexo de membrana b-c₁ (complexo III). Já o citocromo c, que também é um componente da CR, é uma proteína muito menor localizada no lado externo da membrana mitocondrial interna (Marks et al., 1996).

CITOCCROMO c OXIDASE (complexo IV)

A citocromo c oxidase (COX) é o último complexo da CR e transfere elétrons do citocromo a₃ para o O₂. Este complexo é composto pelos citocromos a e a₃ e por um sítio de ligação para o O₂. Cada molécula de O₂ precisa receber quatro elétrons para ser reduzida a 2 H₂O, o que é facilitado pela presença de íons Cu²⁺ na COX (Marks et al., 1996).

BOMBAS DE PRÓTONS

O bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas da mitocôndria ocorre simultaneamente com o transporte de elétrons

entre NADH. H⁺ e CoQ (catalisado pelo complexo I – NADH. H⁺ desidrogenase) e entre CoQ e citocromo c (catalisado pelo complexo III – complexo citocromo b-c₁). A cada ciclo a CoQ recebe 2 prótons e 2 elétrons da matriz mitocondrial. Em seguida, esta enzima transporta os prótons para o espaço intermembranas da mitocôndria, enquanto que doa um elétron de volta para o outro componente do complexo citocromo b-c₁ e o outro para a COX, que também bombeia prótons para fora da matriz mitocondrial e para o espaço intermembranas. O complexo II (succinato desidrogenase) é o único que não atua diretamente como bomba de prótons e participa diretamente do ciclo do ácido cítrico (Lehninger et al., 2001; Marks et al., 1996).

Este fluxo de prótons, gerado durante o transporte de elétrons na CR, impulsiona a síntese de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico pela enzima ATPsintase (Babcoke e Wikström, 1992; Wallace, 1999).

Devido ao papel fundamental que a CR desempenha no metabolismo energético, o dano a um ou mais complexos da cadeia poderá ocasionar queda na síntese de ATP celular (Davey e Clark, 1996). Com base neste contexto, O NO pode atuar como um importante regulador da respiração celular, uma vez que este pode reagir com constituintes celulares produzindo peroxinitrito e outros derivados de NO (Henry e Guissani, 1999).

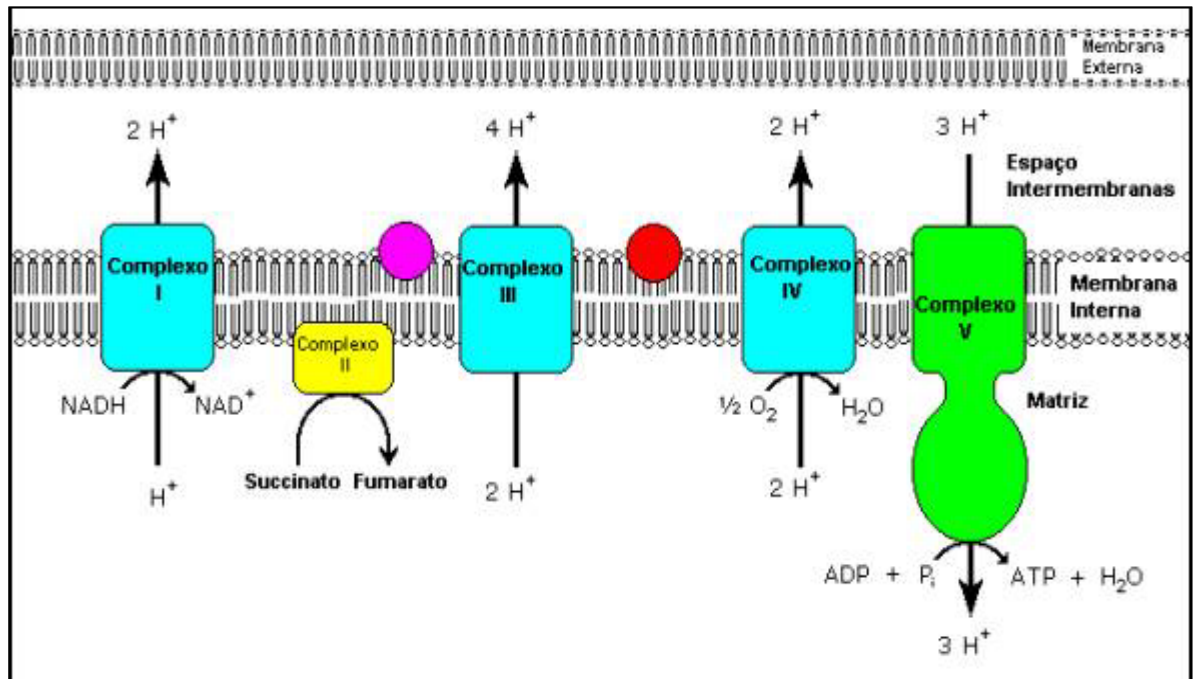


Figura 8. Fluxo de elétrons através dos quatro complexos da cadeia respiratória.

1.5.3 Metabolismo energético e óxido nítrico

A literatura descreve que níveis elevados de NO (em torno de 1mM) podem provocar danos à mitocôndria, os quais podem ser reversíveis ou irreversíveis (Henry et al., 1993; Welter et al., 1996).

O NO é uma espécie reativa, visto que pode reagir rapidamente com O_2^- , produzindo $ONOO^-$, o qual é extremamente citotóxico. Este é capaz de danificar componentes mitocondriais através de reações de oxidação, inibindo assim, a respiração celular. Trabalhos recentes têm mostrado que o $ONOO^-$ danifica ou inibe

os complexos I e II, as enzimas ATPsintase, aconitase, creatina quinase, superóxido dismutase, o DNA mitocondrial e induz o desacoplamento mitocondrial (Sharpe e Cooper, 1998). Por outro lado, Brown e Cooper (1994) relataram que o NO é um potente, rápido e reversível inibidor da COX.

Atualmente, vários autores citam o NO como um inibidor mitocondrial, no entanto, os mecanismo(s) específico(s) pelo(s) qual(is) este provoca inibição da respiração celular é (são) pouco conhecido(s) e de difícil interpretação, uma vez que outros agentes além do NO podem estar envolvidos. No entanto, sabe-se que o NO e seus produtos estão presentes numa série de processos inflamatórios, isquemia e patologias neurodegenerativas (doença de Alzheimer e de Parkinson); e que a inibição mitocondrial é um dos mecanismos pelo qual o NO exerce seus efeitos citotóxicos (Brown, 1999).

2 OBJETIVOS

Considerando que os mecanismos envolvidos na disfunção neurológica característica da hiperargininemia são pouco conhecidos e que dados na literatura mostraram que o NO prejudica o metabolismo energético, este estudo teve como objetivos:

1-) Investigar o efeito da administração aguda de arginina sobre alguns parâmetros do metabolismo energético (produção de CO₂ e lactato, captação de glicose, e medida das atividades da succinato desidrogenase, complexo II e citocromo c oxidase) em hipocampo de ratos.

2-) Avaliar o metabolismo energético em hipocampo de ratos submetidos à administração aguda simultânea de arginina e L-NAME, com a finalidade de investigar a participação do NO sobre os efeitos causados pela arginina.

3 ARTIGO

Reduction of energy metabolism in rat hippocampus by arginine administration

Débora Delwing, Bárbara Tagliari, Emílio Luiz Streck, Clóvis Milton Duval

Wannamacher, Moacir Wajner and Angela Terezinha de Souza Wyse

Brain Research, 983: 58-63, 2003

4 DISCUSSÃO

Os EIM do ciclo da uréia compreendem desordens metabólicas nas quais há uma deficiência enzimática em qualquer uma das etapas da rota ureagênica, tendo como conseqüência o acúmulo de átomos de nitrogênio numa variedade de moléculas, cujo padrão varia conforme o ponto de bloqueio enzimático. Uma característica entre todas as desordens do ciclo da uréia é o aumento dos níveis plasmáticos de amônia. A hiperamonemia confere a estes pacientes um quadro clínico bastante característico, cuja sintomatologia compreende distúrbios gastrointestinais, como perda de apetite e vômitos, e sinais de alterações neurológicas, podendo levar a convulsões e coma. Os pacientes que sobrevivem aos primeiros episódios hiperamonêmicos, ocorridos normalmente nos primeiros dias de vida, geralmente desenvolvem retardo mental (Brusilow e Horwich, 2001).

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

Pacientes hiperargininêmicos apresentam sintomas clínicos que incluem vômitos, irritabilidade, letargia, retardo mental, espasticidade, convulsões e coma. A severa espasticidade é característica de pacientes hiperargininêmicos, não estando presente

nas demais enzimopatias do ciclo da uréia. Todavia, estes sintomas neurológicos não são explicados unicamente pela hiperamonemia ou hiperargininemia, sugerindo-se assim, que outros fatores devam contribuir com estes sintomas neurológicos, tais como, o aumento dos níveis de compostos guanidínicos e/ou NO (Mizutani et al., 1987).

Dados da literatura relatam que pacientes com hiperargininemia apresentam crises epiléticas cujas características clínicas são semelhantes às encontradas em pacientes urêmicos. Os compostos guanidínicos estão aumentados, não só nos fluídos biológicos, mas em diferentes regiões cerebrais, tanto em pacientes urêmicos como nos casos de hiperargininemia, sendo considerados como neurotoxinas em ambos os casos. Muitos destes compostos demonstraram, experimentalmente, ser epileptogênicos ou ter efeito convulsivante (De Deyn e Macdonald, 1990).

Estudos recentes têm mostrado que alguns compostos guanidínicos, incluindo a Arg, são capazes de gerar radical hidroxila em solução aquosa. Em condições patológicas, o aumento na produção destas espécies ativas do oxigênio pode causar danos às membranas celulares, levando a despolarização neuronal, a qual está estreitamente relacionada à epilepsia (Mori et al., 1996). Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que os compostos guanidínicos (NAArg, HArg e ArgA) reduziram em torno de 30 a 40 % a atividade da Na^+, K^+ -ATPase (*in vitro*) de membrana plasmática sináptica de córtex cerebral de ratos (Silva et al., 1999).

O NO é gerado em todo SNC pela enzima NOS, que na presença de O_2 , tetraidrobiopterina e outros cofatores, catalisa a conversão de Arg a NO e citrulina

(Lincoln et al., 1997). Há pelo menos, três isoformas de NOS, as quais são identificadas como nNOS, eNOS e iNOS, sendo que todas podem ser expressas no SNC (Marletta, 1993).

Em condições normais, o NO desempenha importante papel fisiológico no SNC, podendo regular a liberação de neurotransmissores, a expressão gênica e participar na percepção da dor, plasticidade sináptica e aprendizado (Lincoln et al., 1997). Em condições de formação excessiva, o NO é um importante mediador de neurotoxicidade em desordens do SNC (Dawson, V.L. e Dawson, T.M., 1996). O NO é um radical livre e em muitos sistemas biológicos tem meia vida curta, devido a sua reatividade com outros constituintes intracelulares, como o O_2^- (Beckman et al., 1993). A reação entre NO e O_2^- resulta na formação do $ONOO^-$, o qual é citotóxico. A formação deste, é mencionado como um importante fator causador de dano celular (Lipton et al., 1993).

Especula-se que os altos níveis de Arg, encontrados em pacientes hiperargininêmicos, possam resultar em aumento dos níveis cerebrais de NO. Esta suposição foi apoiada pelos achados de Buchmann e colaboradores (1996), onde se verificou aumento nas concentrações de citrulina no cérebro de ratos após a administração aguda de Arg.

A maior parte da energia celular é gerada através da fosforilação oxidativa, um processo que requer a ação de vários complexos enzimáticos respiratórios localizados em uma estrutura especial da membrana mitocondrial interna, a CR mitocondrial (Di Donato, 1997). A CR é composta de quatro complexos (complexo I-IV). O complexo I, também chamado de NADH. H^+ : ubiquinona oxirredutase, realiza a transferência de elétrons do NADH. H^+ para a ubiquinona, formando ubiquinol. Através desta reação,

ocorre o bombeamento de dois prótons para o espaço intermembrana. O complexo II, também denominado de succinato: ubiquinona oxirredutase, é formado pela enzima succinato desidrogenase e três subunidades hidrofóbicas. Este complexo transfere elétrons do succinato para a ubiquinona e também forma ubiquinol. O complexo III, ou citocromo c oxirredutase, transfere elétrons do ubiquinol para o citocromo c, bombeando assim mais quatro prótons. O complexo IV, ou COX transfere elétrons do citocromo c para o O_2 (Voet et al., 2000; Wallace, 1999). O fluxo de prótons gerado durante o transporte de elétrons na CR, direciona a formação de ATP a partir de ADP e PPI através da enzima ATPsintase (Complexo V) (Babcock e Wikstrom, 1992; Wallace, 1999).

A manutenção da atividade de cada complexo enzimático é crítica para o funcionamento normal do cérebro e a diminuição em qualquer dessas atividades pode causar injúria neuronal, uma vez que o cérebro é altamente dependente de energia. A inibição da CR mitocondrial pode ser muito prejudicial ao tecido cerebral, uma vez que no cérebro a fosforilação oxidativa é muito ativa e importante (Di Donato, 2000).

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

Evidências também mostram que o NO inibe o transporte de elétrons através da CR mitocondrial (King et al., 1992; Moreno e Prior, 1995), podendo ocasionar a diminuição da síntese de ATP e o aumento da produção de radicais livres.

Estudos realizados no nosso grupo mostraram que a administração aguda de Arg provocou uma redução significativa na atividade da Na^+, K^+ -ATPase cerebral (Wyse et al., 2001) e uma diminuição de memória em ratos (Reis et al., 2002). Porém estas alterações foram prevenidas pela administração de L-NAME. Outro trabalho realizado em nosso laboratório mostrou que a administração aguda de Arg também aumentou significativamente a peroxidação lipídica (quimiluminescência) e diminuiu a capacidade antioxidante total (TRAP) em cérebro de ratos. Estes efeitos também foram prevenidos pela administração simultânea de Arg e L-NAME (Wyse et al., 2001).

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

Primeiramente, estudamos o efeito da administração de Arg sobre o metabolismo energético, onde investigamos o seu efeito sobre a atividade do ciclo do ácido cítrico, medindo a produção de CO_2 a partir de acetato. O metabolismo anaeróbico foi avaliado através da liberação de lactato a partir de glicose no cérebro de ratos.

Nossos resultados mostraram que a administração aguda de Arg reduziu significativamente a produção de CO_2 , a captação de glicose e aumentou a produção de lactato em hipocampo de ratos, sugerindo que a administração deste aminoácido provavelmente diminuiu a glicólise aeróbica e aumentou a glicólise anaeróbica. Esta

inversão na utilização do metabolismo aeróbico pelo anaeróbico poderá ocasionar diminuição energética celular, provavelmente através da redução da produção de ATP.

Com o propósito de esclarecer a redução energética hipocampal provocada pela administração de Arg, avaliamos a função da CR medindo as atividades de complexos cruciais para a função normal da CR: a succinato desidrogenase, o complexo II e a COX, os quais são considerados marcadores de função neural. Nós observamos que a Arg não alterou a atividade da COX, mas inibiu significativamente as atividades da succinato desidrogenase e do complexo II. Portanto, é possível que a redução nas atividades destas enzimas causada por altos níveis de Arg, possam explicar a redução da captação de glicose e a produção de CO₂ e, conseqüentemente, o aumento da produção de lactato.

Também verificamos o efeito da administração simultânea de L-NAME e Arg sobre os mesmos parâmetros energéticos acima citados. Os resultados mostraram que o L-NAME preveniu a diminuição da captação de glicose e as atividades da succinato desidrogenase e do complexo II provocados pela Arg, o que nos permite propor que esses efeitos possam ser mediados pelo NO e/ou seu derivado ONOO⁻.

Nossos resultados também mostraram que o L-NAME não preveniu a redução da produção de CO₂ e o aumento da liberação de lactato provocados pela Arg, excluindo assim, o envolvimento do NO sobre estas alterações bioquímicas. Uma possível explicação seria que as poliaminas formadas a partir da Arg em condições em que a NOS estivesse inibida (Krichevskaya et al., 1981) poderiam diminuir a atividade do ciclo do ácido cítrico, como foi demonstrado em células endoteliais (Mrhova et al., 1991). No entanto, novos estudos serão necessários para elucidar esta inibição.

Estudos recentes têm mostrado que a arginase é o fator limitante para a síntese de poliaminas em muitos tipos celulares, incluindo células endoteliais e macrófagos, uma vez que a arginase e a NOS utilizam arginina como substrato (Flynn et al., 2002). As poliaminas estão envolvidas em uma série de processos, como por exemplo, regulação da expressão gênica, transdução de sinais, síntese protéica, apoptose e atividade de receptores NMDA (Igarashi e Kashiwagi, 2000).

Em nosso estudo, a administração aguda de Arg não alterou a atividade da COX, e estes resultados, embora aparentemente controversos, estão de acordo com relatos de outros investigadores, mostrando que a COX não é inibida por NO em ratos adultos, tanto em condições fisiológicas como durante a reoxigenação após breve período de anoxia (De Visscher et al., 2002).

Após a análise dos resultados em conjunto, podemos sugerir que a administração aguda de Arg prejudica o metabolismo energético cerebral diretamente ou através do NO e/ou da formação de poliaminas.

É difícil extrapolar nossos achados para a condição humana. No entanto, se a inibição do metabolismo energético causada pela administração de Arg também ocorrer em humanos, é possível que esta esteja associada com a disfunção neurológica característica de pacientes hiperargininêmicos.

5 CONCLUSÕES

1. A administração aguda de arginina reduziu significativamente a produção de CO₂, a captação de glicose e aumentou a produção de lactato em hipocampo de ratos;

2. A administração aguda de arginina não alterou significativamente a atividade da citocromo c oxidase, mas inibiu significativamente as atividades da succinato desidrogenase e do complexo II em hipocampo de ratos;

3. A administração de L-NAME não preveniu a redução da produção de CO₂ e o aumento da liberação de lactato em hipocampo de ratos provocados pela arginina;

4. A administração de L-NAME preveniu a diminuição da captação de glicose e as atividades da succinato desidrogenase e do complexo II em hipocampo de ratos provocados pela arginina.

Assumindo a possibilidade de que os resultados obtidos neste trabalho reproduzam, parcialmente, o que ocorre em humanos, é possível que a inibição do metabolismo energético esteja associada à disfunção neurológica característica de pacientes hiperargininêmicos.

6 ANEXO

Considerando que estudos prévios realizados em nosso laboratório mostraram que a administração aguda de arginina aumentou significativamente a quimiluminescência e diminuiu a capacidade antioxidante total (TRAP) em cérebro médio de ratos, e que estes efeitos foram prevenidos pela administração simultânea de L-NAME, este trabalho teve como objetivos:

1-) Avaliar o efeito da administração aguda de arginina sobre as atividades das enzimas antioxidantes catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase em cérebro médio de ratos;

2-) Avaliar as atividades das enzimas antioxidantes catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase em cérebro médio de ratos submetidos à administração simultânea de arginina e L-NAME.

ARTIGO

Arginine administration reduces catalase activity in midbrain of rats

Débora Delwing, Daniela Delwing, Carlos S. Dutra-Filho, Clóvis M. D.

Wannamacher, Moacir Wajner and Angela T. S. Wyse

NeuroReport, 13 (10): 1301-1304, 2002.

DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que a administração aguda de Arg provocou uma redução significativa na atividade da catalase, não alterando as atividades da superóxido dismutase e da glutathione peroxidase. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados em nosso laboratório, os quais mostraram que a administração de Arg aumenta significativamente a formação de radicais livres (quimiluminescência) e diminuiu a capacidade antioxidante total (TRAP) cerebral, sendo que estes efeitos foram prevenidos pela administração simultânea de L-NAME (Wyse et al., 2001).

Evidências na literatura têm mostrado que o NO inibe a atividade da enzima antioxidante catalase, diminuindo a defesa antioxidante cerebral (Brown, 1995). Por outro lado, NO e seu produto peroxinitrito causam a oxidação da glutathione, resultando na diminuição deste peptídeo antioxidante no cérebro (Luperchio et al., 1996). Com base nestes resultados, nós também investigamos o efeito da administração de L-NAME sobre a atividade da catalase. Esta substância *per se* não alterou a atividade da enzima, mas preveniu a diminuição da atividade da catalase causada pela Arg. Portanto, é possível que o efeito protetor do L-NAME possa ser mediado por sua habilidade de inibir a formação de NO. Wyse e colaboradores (2001) mostraram que o L-NAME preveniu a inibição da Na^+, K^+ ATPase em cérebro de ratos provocada pela Arg.

Conforme a literatura, todos os organismos aeróbicos podem sofrer dano oxidativo, porém, o tecido nervoso é mais suscetível devido ao alto consumo de

oxigênio, a alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados, a baixa defesa antioxidante e os altos níveis de ferro (Halliwell e Gutteridge, 1999; Halliwell, 1996).

Considerando que houve uma redução significativa na atividade da catalase, podemos supor que houve uma alta produção de peróxido de hidrogênio . O peróxido de hidrogênio é produzido na mitocôndria e, cerca de 71 % desta espécie reativa do oxigênio, em condições normais, é metabolizada pela catalase, enquanto que 19 % são metabolizadas pela glutathione peroxidase juntamente com 4 % do radical hidroxila formado. Dessa forma, sugere-se que, com a inibição da catalase, aumente também a formação de radical hidroxila, contribuindo ainda mais para os danos celulares (Gsell et al., 1995).

Sabendo-se que a Arg induz a produção de radicais livres, compromete a capacidade antioxidante total do tecido nervoso e inibe a atividade da enzima catalase provavelmente através da formação de NO, podemos propor que um dos mecanismos pelo qual a Arg é neurotóxica seja pela indução do estresse oxidativo.

CONCLUSÕES

1. A administração aguda de arginina provocou redução significativa na atividade da catalase em cérebro médio de ratos, não alterando a atividade da superóxido dismutase e glutathiona peroxidase;

2. A administração de L-NAME preveniu a diminuição da atividade da catalase causada pela arginina.

Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriormente realizados em nosso laboratório. Especula-se que a redução da atividade da catalase provocada pela Arg, provavelmente ocorra via NO, uma vez que o L-NAME, potente inibidor da NOS, preveniu este efeito. Baseado nestes resultados pode-se dizer que há um importante envolvimento do estresse oxidativo na hiperargininemia.

7 PERSPECTIVAS

1-) Verificar o efeito da administração de antioxidantes sobre alguns parâmetros do metabolismo energético (produção de CO₂ e lactato, captação de glicose, e medida das atividades da succinato desidrogenase, complexo II e citocromo c oxidase) em animais submetidos à administração de Arg em hipocampo de ratos;

2-) Verificar a presença de nitratos e nitritos em hipocampo de ratos submetidos à administração de Arg;

3-) Determinar a atividade da creatina quinase em hipocampo de ratos submetidos à administração de Arg;

4-) Verificar o efeito *in vitro* da Arg e de seus metabólitos (compostos guanidínicos) sobre alguns parâmetros do metabolismo energético (produção de CO₂ e lactato, captação de glicose, e medida das atividades da succinato desidrogenase, complexo II e citocromo c oxidase) em hipocampo de ratos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BABCOCK, G.T. and WIKSTRÖM, M. Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. Nature, 356: 301-309, 1992.
- BARBUL, A. The use of arginine in clinical practice. In: Cynober, L.A., editor. Amino acid metabolism and therapy in health and nutritional disease, New York: CRC Press, pp. 361-372, 1995.
- BATSHAW, M.L., THOMAS, G.H. and BRUSILOW, S.W. New approaches to the diagnosis and treatment of inborn errors of the urea synthesis. Pediatrics., 68: 290-297, 1981.
- BAVARESCO, C.S., CALCAGNOTTO, T., TAGLIARI, B., DELWING, D., LAMERS, M.L., WANNMACHER, C.M., WAJNER, M. and WYSE, A.T. Brain Na⁺,K⁺-ATPase inhibition induced by arginine administration is prevented by vitamins E and C. Neurochem. Res., 28 (6): 825-829, 2003.
- BECKMAN, J.S., CARSON, M., SMITH, C.D. and KOPPENOL, W.H. ALS, SOD and peroxynitrite. Nature, 364: 584, 1993.
- BENSON, P.F. and FENSOM, A.H., Genetic Biochemical Disorders, Oxford: Oxford University Press, pp. 692, 1985.
- BERGENDI, L., BENES, L., DURACKOVA, Z. and FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. Life Sci., 65: 1865-1874, 1999.
- BICKEL, H. Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. Enzyme, 38: 14-26, 1987.

- BOWLING, A.C. and BEAL, M.F. Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases . Life Sci., 56: 1151-1171, 1995.
- BREDT, D.S. and SNYDER, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 682-685, 1990.
- BROWN, G.C. and COOPER, C.E. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. FEBS Lett., 356: 295-298, 1994.
- BROWN, G.C. Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. Eur. J. Biochem., 232: 188-191, 1995.
- BROWN, G.C. Nitric oxide and mitochondrial respiration. Biochim. Biophys. Acta, 1411: 351-369, 1999.
- BRUSILOW, S.W. and HORWICH, A.L. Urea Cycle Enzymes. In: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. eds. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases, New York: McGraw-Hill, 7th ed., pp. 612-663, 1995.
- BRUSILOW, S.W. and HORWICH, A.L. Urea Cycle Enzymes. In: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. eds. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases, New York: McGraw-Hill, 8th ed., pp. 1909-1963, 2001.
- BUCHMANN, I., MILAKOFSKY, L., HARRIS, N., HOFFORD, J.M. and VOGEL, W.H. Effect of arginine administration on plasma and brain levels of arginine and various related amino compounds in the rat. Pharmacology, 53 : 133-142, 1996.
- CASSARINO, D.S. and BENNETT Jr., J.P. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology,

- protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. Brain Res., 29: 1-25, 1999.
- CASSINA, A. and RADI, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. Archives of Biochemistry and Biophysics, 328: 309-316, 1996.
- CEDERBAUM, S.D., SHAW, K.N.F. and VALENTE, M. Hyperargininemia. J. Pediatr., 90: 569-573, 1977.
- CEDERBAUM, S.D., SHAW, K.N.F., SPECTOR, E.B., VERITY, M.A., SNODGRASS, P.J. and SUGARMAN, G.I. Hyperargininemia with arginase deficiency. Pediatr. Res., 13: 827-833, 1979.
- CEDERBAUM, S.D., MOEDJONO, S.J., SHAW, K.N., CARTER, M., NAYLOR, E. and WALZER, M. Treatment of hyperargininaemia due to arginase deficiency with a chemically defined diet. J. Inherit. Metab. Dis., 5 (2): 95-99, 1982.
- COLOMBO, J.P. Argininemia: clinical and biochemical aspects. In: De Deyn, P.P., Marescau, B., Satlon, V. and Quershi, I.A. eds. Guanidino Compounds in Biology & Medicine, John Libbery & Company Ltd., pp. 343-348, 1992.
- DAVEY, G.P. and CLARK, J.B. Threshold effects and control of oxidative phosphorylation in nonsynaptic rat brain mitochondria. J. Neurochem., 66: 1617-1624, 1996.
- DAWSON, V.L., DAWSON, T.M., LONDON, E.D., BREDDT, D.S. and SNYDER, S.H. Nitric oxide mediates glutamate toxicity in primary cortical cultures. Proc. Natl. Acad. Sci., 88: 6368-6371, 1991.

- DAWSON, T.M., STEINER, J.P., DAWSON, V.L., DINERMAN, J.L., UHL, G.R. and SNYDER, S.H. Immunosuppressant, FK 506, enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. Proc. Natl. Acad. Sci., 90: 9808-9812, 1993a.
- DAWSON, V.L. and DAWSON, T.M. Pathologic roles of nitric oxide in the central nervous system. Free Radicals in Brain Physiology and Disorders, 83-100, 1996.
- De DEYN, P.P. and MACDONALD, R.L. Guanidino compounds that increased in cerebrospinal fluid and brain of uremic patients inhibit GABA and glycine responses on mouse neurons in cell culture. Am. Neurol. Assoc., 28: 627-633, 1990.
- DE DEYN, P.P., MARESCAU, B., QURESHI, I.A., CEDERBAUM, S.D., LAMBERT, M., CERONE, R., CHAMOLES, N., SPÉCOLA, N., LEONARD, J.V., GATTI, GREEN, R., KANG, S.S., MIZUTANI, N., REZVANI, I., SNYDERMAN, S.E., TERHEGGEN, H.G., YOSHINO, M., APPEL, B., MARTIN, ROTH, J.J., BEAUDET, A .L., VILARINHO, L., HIRRSCH, E., JAKOBS, K., van DER KNAAP, M.S., NAITO, H ., PICKUT, B.A ., SHAPIRA, S.K ., FUCHSHUBER, A., ROTH, B. and HYLAN, K. Hyperargininemia : a treatable inborn error of metabolism? In: De Deyn, P.P.; Marescau, I.A .;Qureshi, S.D.; Mori, A .(Eds.). Guanidino Compounds in Biology and Medicine, Guildford, U.K.: John Libbery & Co., Vol. 2, pp. 53-69, 1997.
- De VISSCHER, G., SPRINGETT, R., DELPY, D.T., VAN REEMPTS, J., BORGERS, M. and VAN ROSSEM, K. Nitric oxide does not inhibit cerebral cytochrome oxidase in vivo or in the reactive hyperemic phase after brief anoxia in the adult rat. J. Cereb. Blood Flow Metab., 22 : 515-519, 2002.

- DI DONATO, S. Diseases associated with defects of beta-oxidation. In: Rosenberg, R.N.; Prisiner, S.B.; DiMauro, S. and Barchi, R.L. (Eds.) The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease, Boston: Butterworth-Heinemann, 2nd ed., pp. 939-956, 1997.
- DI DONATO, S. Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. J. Inherit. Metab. Dis., 23: 247-263, 2000.
- DUBNOFF, H. and BORSOOK, H. A micromethod for the determination of glycocyanime in biological fluids and tissues. J. Biol. Chem., 138: 381, 1941.
- FEILLET, F. and LEONARD, J.V. Alternative pathway therapy for urea cycle disorders. J. Inher. Metab. Dis., 21: 101-111, 1998.
- FLYNN, N.E., MEININGER, C.J., HAYNES, T.E. and WU, G. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. Biomed. Pharmacother., 56 (9): 427-38, 2002.
- GIUGLIANI, R. Erros inatos do metabolismo: uma visão panorâmica. Pediatria Moderna, Vol. XXIII. 1: 29-40, 1988.
- GLASS, R.D. and KNOX, W.E. Arginase isoenzymes of rat mammary gland, liver and other tissues. J. Biol. Chem., 248: 5785-5789, 1973.
- GOTOH, T., ARAKI, M. and MORI, M. Chromosomal localization of the human arginase II gene and tissue distribution of its mRNA. Biochem. Biophys. Res. Commun., 233: 487-491, 1997.
- GRANT, S.K., GREEN, B.G., STIFFEY-WILUSZ, J., DURETTE, P.L., SHAH, S.K. and KOZARICH, J.W. Structural requirements for human inducible nitric oxide

synthase substrates and substrate analogue inhibitors. Biochemistry, 37: 4174-4180, 1998.

GSELL, W., CONRAD, R., HICKETHIER, M., SOFIC, E., FRÖLICH, L., WICHART, I., JELLINGER, K., MOLL, G., RANSMAYR, G., BECKMANN, H. and RIEDERER, P. Decreased catalase activity but unchanged superoxide dismutase activity in brains of patients with dementia of Alzheimer type. J. Neurochem., 64: 1216-1223, 1995.

HALLIWELL, B. Free radicals, protein and DNA: oxidative damage versus redox regulation. Biochem. Soc. Trans., 24: 1023-1027, 1996.

HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C. Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death. In: Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford: Oxford University Press, 3th ed., pp. 246-349, 1999.

HEALES, S.J.R., BOLAÑOS, J.P., STEWART, V.C., BROOKES, P.S., LAND, J.M. and CLARK, J.B. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. Biochim. Biophys. Acta., 1410: 215-228, 1999.

HENRY, Y., LEPOIVRE, M., DRAPIER, J.C., DUCROCQ, C., BOUCHER, J.L. and GUISSANI, A. EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. FASEB J., 7: 1124-1134, 1993.

HENRY, Y. and GUISSANI, A. Interactions of nitric oxide with hemoproteins: role of nitric oxide in mitochondria. Life Sci., 55: 1003-1014, 1999.

IGARASHI, K. and KASHIWAGI, K. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. Biochem. Biophys. Res. Commun., 271: 559-564, 2000.

- IYER, R., JENKINSON, C.P., VOCKLEY, J.G., KERN, R.M., GRODY, W.W. and CEDERBAUM, S.D. The human arginases and arginase deficiency. J. Inher. Metab. Dis., 21(1): 86-100, 1998.
- JENKINSON, C.P., GRODY, W.W., and CEDERBAUM, S.D. Comparative properties of arginases. Comp. Biochem. Physiol., 114B: 107-132, 1996.
- KAYSEN, G.A. and STRECKER, H.J. Purification and properties of arginase of rat kidney. Biochem. J., 133: 779-788, 1973.
- KING, P.A.; ADNERSON, V.E.; EDWARDS, J.O.; GUSTAFSON, G.; PLUMB, R.C. and SUGGS, J.W. 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, 1992.
- KRICHEVSKAYA, A.A., SHUGALEY, V.S. and TSVETNENKO, E.Z. Brain and liver arginase and polyamines in the mechanism of arginine-protective effect under hyperoxia. Hyyulleten Exper. Biol. Med., 4: 445-447, 1981.
- LACZA, Z., PUSKAR, M., FIGUEROA, J.P., ZHANG, J., RAJAPAKSE, N. and BUSIJA, D.W. Mitochondrial nitric oxide synthase is constitutively active and is functionally upregulated in hypoxia. Free Radical Biology & Medicine, 31: 1609 -1615, 2001.
- LAW, A., GAUTHIER, S., and QUIRION, R. Say NO to Alzheimer's disease: the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type. Brain Res., 35: 73-96, 2001.

- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L. and COX, M.M. Principles of Biochemistry, Worth Publishers, Inc., New York, 3 th ed., 2001.
- LINCOLN, J., HOYLE, C.H.V. and BURNSTOCK, G. Nitric oxide in health and disease. Biochemical Research Topics, Cambridge: Cambridge University Press, pp. 3-11, 1997.
- LIPTON, S.A., CHOI, Y.B., PAN, Z.H., LEI, S.Z., CHEN, H.S.V., SUCHER, N.J., LOSCALZO, J., SINGEL, D.J. and STAMLER, J.S. A redox based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso compounds. Nature , 364 : 626-632, 1993.
- LUPERCHIO, S., TAMIR, S. and TANNEMBAUM, S.R. NO-induced oxidative stress and glutathione metabolism in rodent and human cells. Free Rad. Biol. Med., 21: 513-519, 1996.
- MARESCAU, B., LOWENTHAL, A., TERHEGGEN, H.G., ESMANS, E. and ALDERWEIRELDT, F. Guanidino compounds in hiperargininemia. In: Lowenthal, A.; Mori, A. and Marescau, B. eds. Urea Cycle Diseases- Adv. Exper. Med. Biology., 153: 427-435, 1982.
- MARESCAU, B., DE DEYN, P.P., LOWENTHAL, A., QURESHI, I.A., ANTONOZZI, I., BACKMANN, C., CEDERBAUM, S.D., CERONE, N., CHAMOLES, N., COLOMBO, J.P., HYLAND, K., GATTI, R., KANG, S.S., LETARTE, L., LAMBERT, M., MINUTANI, N., POSSEMIERS, I., REZVANI, I., SNYDERMAN, S.E., TERHEGGEN, H.G. and YOSHINO, M. Guanidino compounds analysis as a complementary diagnostic parameter for hyperargininemia: follow-up of guanidine compounds levels during therapy. Pediatr. Res., 27(3): 297-303, 1990.

- MARESCAU, B., DE DEYN, P.P., QURESHI, I.A., ANTONOZZI, I., BACHMANN, C., CEDERBAUM, S.D. et al. Guanidino compounds in hyperargininemia. In: De Deyn, P.P.; Marescau, B.; Satlon, V. and Qureshi, I.A. eds. Guanidino Compounds in Biology & Medicine., John Libbey & Company Ltd., pp. 363-371, 1992.
- MARKS, D.B., MARKS, A.D. and SMITH, C.M. Oxidative Phosphorilation and the Electron Transport Chain. In: Basic Medical Biochemistry, Baltimore, Williams & Wilkins, 1996.
- MARLETA, M.A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. J. Biol. Chem., 268: 12231-12234, 1993.
- MIZUTANI, N., MAEHARA, M., HAYAKAWA, C., KATO, T., WATANABE, K. and SUZUKI, S. Hyperargininemia: clinical course and treatment with sodium and phenylacetic acid. Brain Dev., 5: 555-563, 1983.
- MIZUTANI, N., HAYAKAWA, C., OHYA, Y., WATANABE, K., WATANABE, Y. and MORI, A. Guanidino compounds in hyperargininemia. Tohoku J. Exp. Med., 153: 197-205, 1987.
- MORENO, J.J. and PRYOR, W.A. Inactivation of I-proteinase inhibitor by peroxynitrite. Chem. Res. Toxicol., 5: 425-431, 1995.
- MORI, A., KOHNO, M., MASUMIZU, T., NODA, Y. and PACKER, L. Guanidino compounds generate reactive oxygen species. Biochem. Mol. Biol. Int., 40(1): 135-143, 1996.
- MORI, M., GOTOH, T., NAGASAKI, A., TAKIGUCHI, M. and SONOKI, T. Regulation of the urea cycle enzyme genes in nitric oxide synthesis. J. Inher. Metab. Dis. 21 (1): 59-71, 1998.

- MRHOVA, O., HLADOVEC, J., URBANOVA, D. and ROSSMANN, P. The effect of polyamines on the endothelium and vascular wall metabolism in the rat. Czech Med. , 14 : 97-105, 1991.
- MSALL, M., BATSHAW, M.L., SUSS, R., BRUSILOW, S.W. and MELLITS, E.D. Neurologic outcome in children with inborn errors of urea synthesis. New Engl. J. Med., 1500-1505, 1984.
- NATELSON, S. and SHERWIN, J.E. Proposed mechanisms for urea nitrogen reutilization : relationship between urea and proposed guanidine cycles. Clin. Chem., 25: 1343-1344, 1979.
- NELSON, D.L. and COX, M.M. Lehninger. Principles of Biochemistry, New York: Worth Publishers, 3rd ed., 2000.
- PISANO, J.A. and UNDERFRIEND, S. Biosynthesis and disposition of γ -guanidinobutyric acid in mammalian tissues. Arch. Biochem. Biophys. 100: 323, 1963.
- POLLOCK, J.S., FÖRSTERMANN, U., MITCHELL, J.A., WARNER, T.D., SCHMIDT, H.H.H.W., NAKANE, M. and MURAD, F. Purification and characterization of particulate and endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci., 88: 10480-10484, 1991.
- REIS, E.A., OLIVEIRA, L.S., LAMERS, M.L., NETTO, C.A. and WYSE, A.T.S. Arginine administration inhibits hippocampal Na^+ , K^+ -ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. Brain Res., 951 (2): 151-157, 2002.

- SCRIVER, C.R., BEAUDET, A. L., SLY, W.S. and VALLE, D. eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease, McGraw-Hill, Inc., New York, 8th ed., 2001.
- SHARPE, M.A. and COOPER, C.E. Interactions of peroxynitrite with mitochondrial cytochrome oxidase. Catalytic production of nitric oxide and irreversible inhibition of enzyme activity. J. Biol. Chem., 273: 30961-30972, 1998.
- SILVA, C.G., PAROLO, E., STRECK, E.L., WAJNER, M., WANNMACHER, C.M.D. and WYSE, A.T.S. In vitro inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity from rat cerebral cortex by guanidine compounds accumulating in hyperargininemia. Brain Res., 838: 78-84, 1999.
- SNYDERMAN, S.E., SANSARICQ, C., CHEN, W.J., NORTON, P.M. and PHANSALKAR, S.V. Argininemia. J. Pediatr., 90: 563-568, 1977.
- SNYDERMAN, S.E., SANSARICQ, C., NORTON, P.M. and GOLDSTEIN, F. Argininemia treated from birth. J. Pediatr., 95 (1): 61-63, 1979.
- SPECTOR, E.B., KIERNAN, M.B. and CEDERBAUM, S.D. Properties of fetal and adult red blood cell arginase: a possible diagnostic test for arginase deficiency. Am. J. Hum. Genet., 32: 79-87, 1980.
- SPECTOR, E.B., RICE, S.C.H. and CEDERBAUM, S.D. Immunologic studies of arginase in tissues of normal humans adults and arginase-deficient patients. Pediatr. Res., 17: 941-944, 1983.
- STAMBURY, J.B., WYNGAARDEN, J.B., FREDRICKSON, D.S., GOLDSTEIN, J. L. and BROWN, M.S. Inborn errors of metabolism in the 1980's In: The metabolic basis of inherited diseases, New York: McGraw Hill, 6th ed., pp. 3-59, 1983.

STRYER, L. Bioquímica, 4ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996.

STUEHR, D.J., CHO, H.J., SOO KWON, N., WEISE, M.F. and NATHAN, C.F. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci., 88: 7773-7777, 1991.

TAPIERO, H., MATHÉ, G., COUVREUR, P. and TEW, K.D. Dossier: Free amino acids in human health and pathologies. Arginine. Biomed. Pharmacother, 56: 439-445, 2002.

VOET, D., VOET, J.G. and PRATT, C.W. Metabolismo dos Aminoácidos. In: Fundamentos de Bioquímica, Porto Alegre, Artes Médicas Sul, 3 ed., 2000.

VOET, D., VOET, J.G. and PRATT, C.W. Transporte de elétrons e fosforilação oxidativa. In: Fundamentos de Bioquímica, Porto Alegre, Artes Médicas Sul, 3 ed., 2000.

WAKABAYASHI, Y. The glutamate crossway. In: Cynober, L.A., editor. Amino acid metabolism and therapy in health and nutritional disease, New York: CRC Press, pp. 89-98, 1995.

WALLACE, D.C. Mitochondrial diseases in man and mouse. Science, 283 (5407), 1482-1487, 1999.

WELTER, R., YU, L. and YU, C.-A. The effects of NO on electron transport complexes. Arch. Biophys. Biochem., 331: 9-14, 1996.

WYSE, A.T.S., BAVARESCO, C.S., BANDINELLI, C., STRECK, E.L., FRANZON, R., DUTRA-FILHO, C.S. and WAJNER, M. 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, 2001.

YOSHINO, M., KUBOTA, K., YOSHIDA, I., MURAKAMI, T. and YAMASHITA, F. Argininemia: Report of a new cause and mechanisms of orotic aciduria and hiperammonemia. In: Lowenthal, A., Mori, A. and Marescau, B. eds. Urea Cycle Diseases. Adv. Exper. Med. Biol., 153: 121-125, 1982.