

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**ESTUDO DO PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÓRTEX CEREBRAL DE  
RATOS SUBMETIDOS AO MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERPROLINEMIA  
TIPO II**

**DANIELA DELWING**

**ORIENTADORA**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angela Terezinha de Souza Wyse**

**CO-ORIENTADOR**

**Prof. Dr. Carlos Severo Dutra-Filho**

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

**“A vida só vale a pena ser vivida quando  
se faz alguma coisa pela vida em vida.  
Servindo ao semelhante com  
sensibilidade de artista, com ciência e  
conhecimento de profissional e com amor e  
dedicação de ser humano.”  
(Autor desconhecido)**

## **AGRADECIMENTOS**

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

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Carlos Severo Dutra-Filho pela colaboração, atenção e ensinamentos.

Aos Profs. Clóvis M. D. Wannmacher e Moacir Wajner pelos ensinamentos e amizade.

Aos bolsistas e colegas alunos de pós-graduação pela amizade, companheirismo, trabalhos e festas realizadas.

Aos meus pais (Ciro e Dalila) por me incentivarem sempre e por acreditarem em meus sonhos.

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

À minha irmã Débora por estar ao meu lado em mais um passo de minha vida.

Ao meu irmão Fábio pelo apoio constante e carinho.

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

A Deus, pela oportunidade de viver.

## RESUMO

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

O estresse oxidativo é um importante processo que vem sendo relatado na patogênese de algumas condições que afetam o sistema nervoso central (SNC), como é o caso das doenças neurodegenerativas, epilepsia e demência. Este fato torna-se facilmente compreensível, visto que o SNC é altamente sensível ao estresse oxidativo, em face do alto consumo de oxigênio; do alto conteúdo lipídico, principalmente de ácidos graxos poliinsaturados, dos altos níveis de ferro e da baixa defesa antioxidante.

Considerando que: a) pouco se sabe a respeito dos altos níveis de prolina no SNC, b) a prolina ativa receptores NMDA e é epileptogênica e c) o estresse oxidativo está associado com doenças que afetam o SNC, no presente estudo investigamos os efeitos *in vivo* e *in vitro* da prolina sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo, como a quimiluminescência, o potencial antioxidante total (TRAP), e sobre as atividades das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e superóxido dismutase (SOD) em córtex cerebral de ratos Wistar.

Os resultados mostraram que a administração aguda de prolina aumentou significativamente a quimiluminescência e reduziu o TRAP em córtex cerebral de ratos de 10 e 29 dias. Em contraste, a administração crônica de prolina não alterou estes parâmetros. Todavia, a presença de prolina no homogeneizado de córtex cerebral de ratos de 10 e 29 dias aumentou significativamente a quimiluminescência e reduziu o TRAP em concentrações de prolina semelhantes àsquelas encontradas nos tecidos de pacientes hiperprolinêmicos (0,5 – 1,0 mM).

Nossos resultados também mostraram que a administração aguda de prolina não alterou as atividades das enzimas GSH-Px e SOD em córtex cerebral de ratos de 10 e 29 dias, mas diminuiu significativamente a atividade da CAT em ratos de 29 dias. Por outro lado, a administração crônica de prolina não alterou a atividade da enzima SOD, mas significativamente aumentou a atividade da CAT e reduziu a atividade da GSH-Px. Em adição, a presença de prolina no homogeneizado de córtex cerebral reduziu significativamente a atividade da SOD em ratos de 10 dias, permanecendo as atividades da CAT e GSH-Px inalteradas. Todavia, as atividades das enzimas antioxidantes não foram alteradas na presença de prolina no homogeneizado de córtex cerebral de ratos de 29 dias.

Os resultados obtidos em nosso trabalho sugerem que o estresse oxidativo induzido pela prolina pode estar envolvido na disfunção cerebral observada na hiperprolinemia tipo II.

## ABSTRACT

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

Oxidative stress is an important event that has been related to the pathogenesis of some conditions affecting the central nervous system (CNS) such as neurodegenerative disorders, epilepsy and dementia. This is understandable since the CNS is highly sensitive to oxidative stress due to its high oxygen consumption, its high iron and lipid contents, especially polyunsaturated fatty acids, and the low activity of antioxidant defenses.

Considering that: a) very little is known about the role of high sustained levels of proline in CNS, b) proline activates NMDA receptor and is epileptogenic and c) the oxidative stress is associated with diseases that affect the CNS, in the present study we determined the *in vivo* and *in vitro* effects of proline on some parameters of oxidative stress, such as chemiluminescence, total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) and the activities of the antioxidant enzymes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) in Wistar rat cerebral cortex.

The results showed that acute administration of proline significantly increased chemiluminescence and decreased TRAP in cerebral cortex of 10-day-old and 29-day-old rats. In contrast, chronic administration of proline did not alter these parameters. Furthermore, the presence of proline in the homogenates of cerebral cortex of 10-day-old and 29-day-old rats significantly increased chemiluminescence and decreased TRAP at proline concentrations similar to those observed in tissues of hyperprolinemic patients (0.5 – 1.0 mM).

Our results also showed that acute administration of proline did not alter the activities of GSH-Px and SOD in cerebral cortex of 10-day-old and 29-day-old rats, but significantly decreased CAT activity in 29-day-old rats. On the other hand, chronic administration of proline did not alter SOD, but significantly increased CAT and decreased GSH-Px activities. In addition, the presence of proline in the homogenates of cerebral cortex significantly reduced SOD activity in 10-day-old-rats, but did not alter CAT and GSH-Px activities. However, the activities of the antioxidant enzymes were not affected by the presence of proline in the homogenates of cerebral cortex of 29-day-old rats.

The results obtained in our study suggest that oxidative stress induced by proline may be involved in the brain dysfunction observed in hyperprolinemia type II.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>1.1 Erros Inatos do Metabolismo</b> .....	01
<b>1.2 L-Prolina</b> .....	04
<b>1.3 Hiperprolinemias</b> .....	10
1.3.1 Conceito e Classificação.....	10
1.3.2 Hiperprolinemia Tipo II.....	11
1.3.2.1 Conceito.....	11
1.3.2.2 Diagnóstico.....	13
1.3.2.3 Manifestações clínicas.....	14
1.3.2.4 Tratamento.....	16
<b>1.4 Modelo animal de hiperprolinemia tipo II</b> .....	17
<b>1.5 Radicais Livres</b> .....	18
1.5.1 Definição e generalidades.....	18
1.5.2 Espécies Reativas do Oxigênio.....	21
1.5.3 Espécies Reativas do Nitrogênio.....	25
<b>1.6 Estresse Oxidativo</b> .....	28
1.6.1 Mecanismos de Dano Celular por Estresse Oxidativo.....	29
1.6.1.1 Lipoperoxidação.....	29
1.6.1.2 Dano às proteínas.....	31
1.6.1.3 Dano ao DNA.....	31
1.6.2 Sistema de Defesa Antioxidante.....	32

1.6.2.1 Enzimas Antioxidantes.....	33
1.6.2.2 Vitaminas Antioxidantes.....	37
<b>1.7 Estresse oxidativo e Doenças neurodegenerativas.....</b>	<b>39</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
<b>3 ARTIGOS.....</b>	<b>43</b>
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>6 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>57</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>58</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura geral de um $\alpha$ -aminoácido.....	04
FIGURA 2. Estrutura da prolina.....	05
FIGURA 3. Rotas metabólicas de biossíntese e degradação da prolina.....	09
FIGURA 4. Rota metabólica da prolina, indicando o local de bloqueio na hiperprolinemia tipo II.....	12
FIGURA 5. Reação entre dois radicais livres - ligação covalente.....	20
FIGURA 6. Desintegração homolítica do peróxido de hidrogênio.....	23
FIGURA 7. Produção do radical hidroxila através da Reação de Fenton.....	23
FIGURA 8. Reação de redução do íon ferro.....	23
FIGURA 9. Produção do radical hidroxila através da Reação de Fenton.....	24
FIGURA 10. Produção do radical hidroxila através da Reação de Haber-Weiss.....	24
FIGURA 11: Formação de ROS a partir do oxigênio molecular.....	27
FIGURA 12. Estresse oxidativo x mecanismos de defesa.....	28
FIGURA 13. Reação de dismutação do radical superóxido.....	33
FIGURA 14. Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima catalase.....	34
FIGURA 15. Reação catalisada pela enzima glutaciona peroxidase. Outros hidroperóxidos podem ser utilizados como substrato da reação.....	36
FIGURA 16. Reação de redução da glutaciona pela glutaciona redutase.....	36
FIGURA 17. Redução do oxigênio à água.....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA: (RS)- $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato

ATP: adenosina 5'-trifosfato

CAT: catalase

Cu<sup>+</sup>: íon cuproso

Cu<sup>++</sup>: íon cúprico

CuZn-SOD: cobre-zinco superóxido dismutase

Mn-SOD: manganês superóxido dismutase

Fe-SOD: ferro superóxido dismutase

DNA: ácido desoxirribonucléico

EIM: erros inatos do metabolismo

FAD: flavina adenina dinucleotídeo

Fe<sup>2+</sup>: íon ferroso

Fe<sup>3+</sup>: íon férrico

GR: glutationa redutase

GSH: glutationa (forma reduzida)

GSH-Px: glutationa peroxidase

GSSG: glutationa (forma oxidada)

H<sub>2</sub>O: água

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio

NAD<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NADP<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: óxido nítrico

O<sub>2</sub>: oxigênio molecular

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: ânion superóxido

O<sub>2</sub><sup>2-</sup>: íon peróxido

OH<sup>•</sup>: radical hidroxila  
OH<sup>-</sup>: ânion hidroxila  
ONOO<sup>-</sup>: ânion peroxinitrito  
P5C: pirrolino-5-carboxilato  
PROT: transportadores de prolina  
R<sup>•</sup>: radical livre  
RNA: ácido ribonucléico  
RNAm: ácido ribonucléico mensageiro  
RNS: espécies reativas do nitrogênio  
ROS: espécies reativas do oxigênio  
SNC: sistema nervoso central  
SOD: superóxido dismutase  
TRAP: potencial antioxidante total

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 *Erros Inatos do metabolismo*

Os 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).

A partir do conceito “um gene – uma enzima” expresso na década de 40 por Beadle e Tatum, foi possível estabelecer uma relação mais definida entre os aspectos bioquímicos e genéticos. Considerando este conceito, estipula-se que todos os processos bioquímicos no organismo estão sob controle gênico, portanto, sujeitos a serem realizados de forma deficiente, sempre que uma mutação se manifestar (Stambury et al., 1983).

O termo “erro inato do metabolismo” foi sugerido por Sir Archibald Garrod em 1908. Atualmente, ele é usado para descrever mais de 500 defeitos (Scriver et al., 2001), a maioria deles envolvendo processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Benson e Fensom, 1985).

Abaixo, encontra-se 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). Estudos realizados em grupos considerados de alto risco indicam uma freqüência de EIM mais de 100 vezes maior nesses indivíduos, em relação à população em geral (Wannmacher et al., 1982).

Os EIM geralmente são doenças graves que podem resultar em morte neuronal. Estas doenças manifestam-se na infância. Por outro lado, os EIM podem ser absolutamente assintomáticos (Holtzman, 1978).

O tratamento dos EIM será mais bem sucedido quanto mais precoce for o diagnóstico.

Existem diversas maneiras de abordar terapeuticamente os EIM (Stambury et al., 1983):

- a) limitando a entrada do precursor;
- b) suplementando o metabólito ausente;
- c) inibindo a formação da substância acumulada;
- d) inibindo o acúmulo de uma determinada substância;
- e) controlando os fatores desencadeantes;
- f) aumentando a atividade enzimática;
- g) suplementando a proteína não enzimática deficiente; ou
- h) suplementando a enzima deficiente.

Os EIM mais comuns são os de aminoácidos, sendo exemplos a fenilcetonúria, a homocistinúria e a hiperprolinemia, que apresentam acúmulo tecidual de fenilalanina, homocisteína e prolina, respectivamente.



## 1.2 L-Prolina

Os aminoácidos são conhecidos como  $\alpha$ -aminoácidos porque possuem um grupo amino primário (-NH<sub>2</sub>) e um grupo carboxílico (-COOH) como substituintes do mesmo átomo de carbono (o carbono  $\alpha$ ) (Voet et al., 2000).

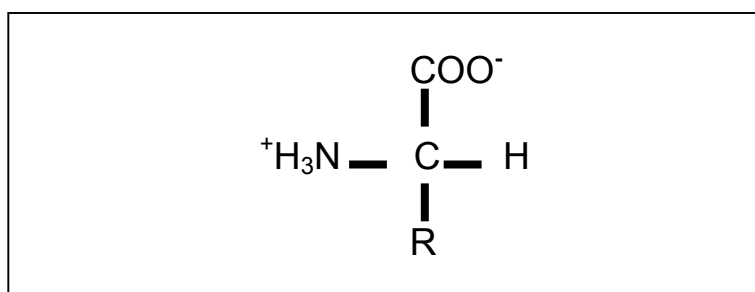


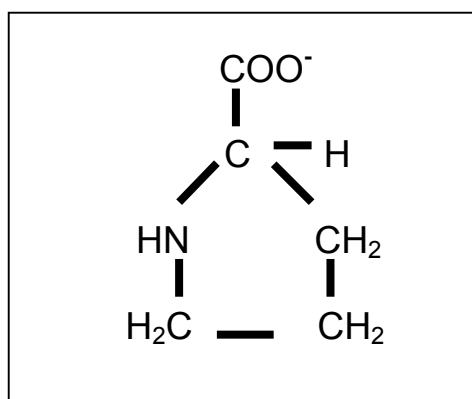
Figura 1. Estrutura geral de um  $\alpha$ -aminoácido.

A análise de um grande número de proteínas mostrou que elas são compostas de 20 aminoácidos-padrão. Porém, não são todas as proteínas que contêm todos os 20 aminoácidos, mas grande número delas contêm a maioria deles (Voet et al., 2000).

Os aminoácidos diferem uns dos outros através de suas cadeias laterais, que variam em estrutura e carga elétrica (Lehninger et al., 2001).

De acordo com Voet e colaboradores (2000), os aminoácidos são classificados pela polaridade de suas cadeias laterais. São descritos três tipos principais de aminoácidos: os com grupos R apolares, os com grupos R polares não carregados e os com grupos R polares carregados.

A L-prolina (prolina) é classificada como aminoácido de cadeias laterais apolares, possuindo um grupo pirrolidina cíclico na cadeia lateral (Voet et al., 2000).



**Figura 2. Estrutura da prolina**

A prolina é um aminoácido não essencial em crianças e adultos, e condicionalmente essencial em prematuros (Phang et al., 2001). A prolina possui um grupo amino secundário (-NH) em sua estrutura química, o qual forma uma base de Schiff (imino), considerada uma reação bioquímica importante entre uma amina e um aldeído, o que lhe confere a denominação de iminoácido (Voet e Voet, 1999).

A prolina, em sua rota metabólica, pode ser sintetizada a partir de ornitina e glutamato, tendo como intermediários comuns pirrolino-5-carboxilato (P5C) ou glutamato - $\gamma$ -semialdeído (Phang et al., 2001) (Figura 3).

A prolina oxidase, que se localiza no fígado, rim e cérebro, é a primeira enzima envolvida na degradação da prolina, dando origem ao P5C, que pode ser degradado

a glutamato pela pirrolino-5-carboxilato-desidrogenase (P5C desidrogenase). Esta enzima localiza-se na matriz mitocondrial (Phang et al., 2001).

A conversão de glutamato em prolina envolve a redução do grupo  $\gamma$ -carboxil a um aldeído, seguido da formação de uma base de Schiff interna, cuja redução posterior leva à formação da prolina. A redução do grupo  $\gamma$ -carboxil do glutamato em um aldeído caracteriza-se por ser um processo endoergônico facilitado, primeiramente pela fosforilação do grupo carboxila em uma reação catalisada pela  $\gamma$ -glutamil-quinase. Presume-se que o glutamato-5-fosfato seja o substrato para a redução seguinte. O glutamato-5-semialdeído resultante cicliza espontaneamente para formar a base de Schiff interna,  $\Delta^1$ -pirrolino-5-carboxilato, o qual é reduzido à prolina pela enzima pirrolino-5-carboxilato-redutase (P5C redutase) (Voet et al., 2000; Marks et al., 1996).

A enzima bifuncional, pirrolino-5-carboxilato-sintase, é responsável pela conversão de glutamato a P5C. Esta enzima caracteriza-se por ser ATP e NADPH dependente, e também por possuir alta atividade na mucosa do intestino delgado e atividade mensurável no cólon, pâncreas, timo e cérebro. A enzima P5C redutase, que catalisa a conversão de P5C em prolina, tem como cofator NADH ou NADPH e é encontrada em todos os tecidos (Phang et al., 2001, Flynn et al., 2002).

A enzima ornitina- $\gamma$ -aminotransferase (OAT) catalisa a conversão de ornitina a P5C, com um  $\alpha$ -cetoácido, como o  $\alpha$ -cetoglutarato, como acceptor amino (Phang et al., 2001).

Cabe ressaltar que o P5C, além de ser um intermediário intracelular no metabolismo da prolina, também é um constituinte do plasma humano. Os níveis de

P5C oscilam de 0,2 mM (manhã) à cerca de 2,0 mM (noite), estando associados com as refeições (Phang et al., 2001).

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

Prolina e P5C também possuem função importante na transferência redox entre compartimentos celulares. Esta função se deve a localizações celulares e distribuições teciduais das enzimas que catalisam as interconversões de P5C e prolina (prolina oxidase, localizada na membrana mitocondrial interna e P5C redutase, localizada no citosol) (Phang et al., 2001).

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

Interessantemente, a prolina se enquadra em vários critérios clássicos utilizados para definir um neurotransmissor no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos, tais como:

- ◆ biossíntese em sinaptossomas,
- ◆ acúmulo em sinaptossomas por mecanismo de transporte  $\text{Na}^+$ -dependente de alta afinidade após despolarização induzida por  $\text{K}^+$  (Cohen e Nadler, 1997).
- ◆ distribuição regional no cérebro, principalmente em certas rotas glutamatérgicas (Phang et al., 2001).

Dados na literatura mostram que os RNAm que codificam transportadores de prolina (PROT ) são expressos em subpopulações de neurônios glutamatérgicos em cérebro de ratos, o que indica que a prolina pode ser um substrato natural na modulação de rotas específicas de transmissão sináptica excitatória no SNC (Fremeau et al., 1992, Velaz-Faircloth et al., 1995). A alta afinidade destes transportadores para captação de prolina extracelular pode indicar seu papel na potencialização de transmissão excitatória naquelas sinapses que expressam PROT (Cohen e Nadler, 1997).

Outros autores descrevem que a prolina bloqueia a liberação de glutamato, alterando a permeabilidade da membrana neuronal ao sódio e diminuindo a condutibilidade local, levando a uma falha na transmissão nervosa e amnésia (Keller et al., 1981).

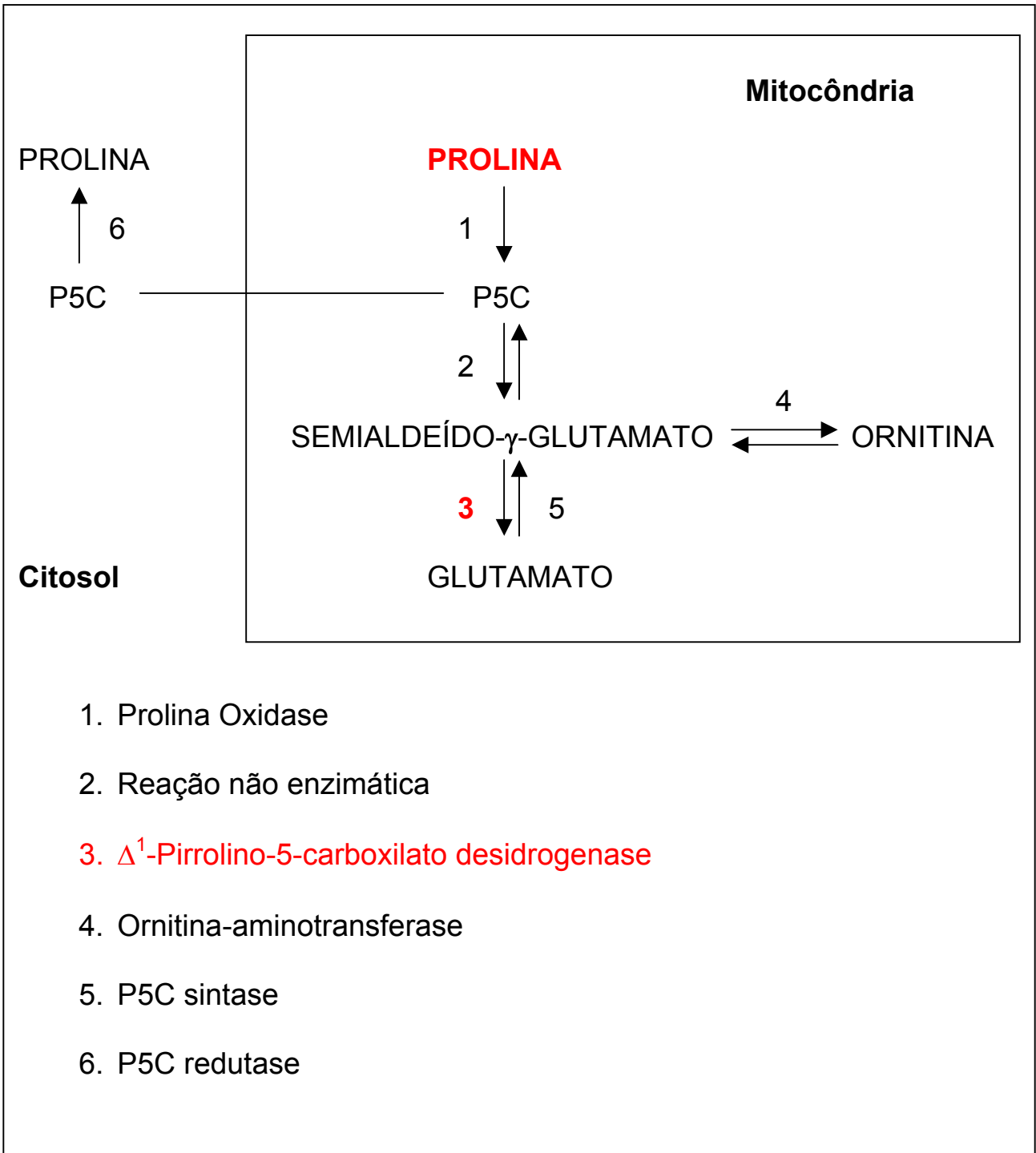


Figura 3. Rotas metabólicas de biossíntese e degradação da prolina.

## **1.3 Hiperprolinemias**

### 1.3.1 Conceito e Classificação

Hiperprolinemias são EIM da prolina causados pela deficiência de enzimas envolvidas na sua rota de degradação, o que resulta no acúmulo tecidual de prolina. A degradação da prolina envolve sua conversão em P5C pela prolina oxidase e de P5C a glutamato pela P5C desidrogenase (Phang et al., 2001).

As hiperprolinemias caracterizam-se pela elevação anormal de prolina no plasma e no fluido cérebro-espinhal (Phang e Scriver, 1989) e são classificadas em tipo I e II.

A hiperprolinemia tipo I é causada pela deficiência na atividade da enzima prolina oxidase, impossibilitando assim a oxidação de prolina a P5C (Efron, 1965; Phang et al., 2001).

Registros científicos indicam que não existem relações causais entre a deficiência da prolina oxidase e manifestações clínicas. O diagnóstico da hiperprolinemia tipo I é feito por exclusão, uma vez que a desordem não é confirmada pela demonstração direta da deficiência da prolina oxidase, já que a atividade desta enzima não é expressa em leucócitos ou em cultura de fibroblastos, os quais são considerados testes adequados para a realização dos exames. Por outro lado, a P5C desidrogenase, enzima que se encontra deficiente na hiperprolinemia tipo II, é expressa em leucócitos e em cultura de fibroblastos. Portanto, detecta-se a hiperprolinemia tipo I se os pacientes não apresentarem deficiência na atividade da

enzima P5C desidrogenase (Phang et al., 2001). A concentração plasmática de prolina na hiperprolinemia tipo I oscila entre 700 e 2400  $\mu\text{M}$  (Phang et al., 2001).

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

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

O presente trabalho deteve-se no estudo da hiperprolinemia tipo II, em face de sua associação com manifestações neurológicas e também a fim de dar continuidade a outros estudos realizados no nosso grupo de pesquisa.

### 1.3.2 Hiperprolinemia Tipo II

#### 1.3.2.1 Conceito

É uma doença autossômica recessiva do metabolismo de aminoácido causada pela deficiência hepática na atividade da  $\Delta^1$ -pirrolino-5-carboxilato-desidrogenase (P5CDh), o que resulta no acúmulo tecidual de prolina (Phang et al., 2001) (Figura 4).



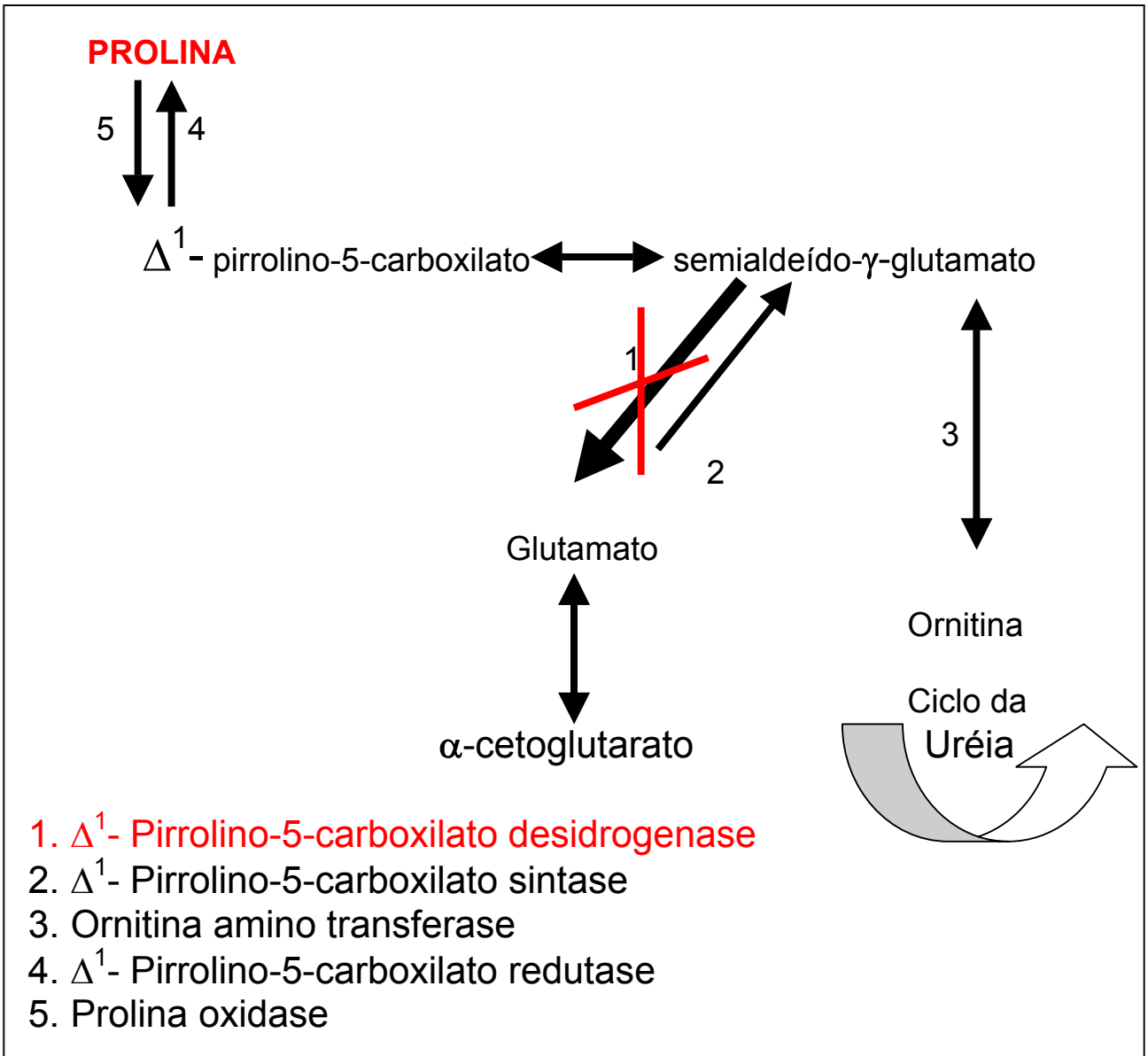


Figura 4. Rota metabólica da prolina, indicando o local de bloqueio na hiperprolinemia tipo II.

### 1.3.2.2 Diagnóstico

O diagnóstico da hiperprolinemia tipo II é baseado nos níveis aumentados de prolina sérica e no fluido cérebro-espinhal, os quais oscilam entre 500- 3700  $\mu\text{M}$  (valores indivíduos normais: 50-270  $\mu\text{M}$ ) e 20-50  $\mu\text{M}$  (valores indivíduos normais: 1-4  $\mu\text{M}$ ), respectivamente (Phang et al., 2001; Emery et al., 1968; Phang e Scriver, 1989). Embora ocorra aumento nos níveis plasmáticos e urinários de P5C, cujas concentrações encontram-se de 10 a 40 vezes mais elevadas do que os valores normais (Phang et al., 2001) e de glutamato no líquido (Van Harreveld e Fifková, 1973; Rhoads et al., 1983; Phang et al., 2001), o principal metabólito acumulado quantitativamente na hiperprolinemia tipo II é a prolina.

Na hiperprolinemia tipo II homozigótica, os valores de prolina sérica geralmente excedem 1500  $\mu\text{M}$ ; em contraste com os heterozigóticos em que os valores de prolina são normais (Phang et al., 2001).

A prolina é o único aminoácido com concentrações plasmáticas anormais nos pacientes hiperprolinêmicos, enquanto que na urina ocorre aumento de prolina, hidroxiprolina e glicina (Phang et al., 2001).

Outro aspecto notável é a iminoglicinúria, que pode se estabelecer pela competição da prolina com outros aminoácidos que compartilham um sistema comum de transporte renal (Applegarth et al., 1974; Goodman et al., 1974). Quando os níveis de prolina plasmáticos excedem 800  $\mu\text{M}$ , a iminoglicinúria presente nos pacientes torna-se diretamente proporcional à concentração de prolina plasmática. A iminoglicinúria, portanto, desencadeia-se pelo fato de prolina, glicina e hidroxiprolina

utilizarem o mesmo transportador; assim quando a prolina estiver em altas concentrações, o transporte dos outros substratos será inibido por competição. O excesso de prolina satura o mecanismo de transporte tubular, ocasionando a prolinúria (Phang et al., 2001).

A excreção de P5C na urina pode ser qualitativamente identificada pela reação com O-aminobenzaldeído e ácido tricloroacético em álcool, o que produz coloração amarela (Phang et al., 2001). A análise quantitativa do P5C no plasma e na urina pode ser obtida em testes específicos (Mixon et al., 1991; Fleming et al., 1984). O P5C também pode ser determinado no plasma pela confirmação da deficiência na atividade da enzima P5C desidrogenase em extrato de cultura de fibroblastos ou de leucócitos. A enzima é responsável por catalisar o segundo passo na degradação da prolina e da hidroxiprolina (Phang et al., 2001).

Um segundo metabólito é excretado na urina, o  $\Delta^1$ -pirrolino-3-hidroxi-5-carboxilato, composto derivado do 4-hidroxi-L-prolina. Através de teste realizado com 4-hidroxi-L-prolina (100 mg/kg/marcada) ocorre aumento urinário de  $\Delta^1$ -pirrolino-3-hidroxi-5-carboxilato, o que se associa com o clearance de hidroxiprolina plasmático (Phang et al., 2001).

### 1.3.2.3 Manifestações clínicas

Embora ainda não esteja estabelecido se a hiperprolinemia tipo II é uma desordem benigna ou uma doença que afeta o SNC, os dados na literatura evidenciam que a hiperprolinemia tipo II tem associação causal com manifestações

nerológicas (Phang et al., 2001). Mesmo sendo tais manifestações encontradas em um considerável número de pacientes hiperprolinêmicos, os mecanismos pelos quais ocorrem são pouco compreendidos (Fremeau et al., 1992).

Alguns autores sugerem que níveis elevados de prolina no plasma e no fluido cérebro-espinhal não são suficientes para causar dano neurológico, uma vez que pacientes com hiperprolinemia tipo I e II apresentam aumento nos níveis teciduais de prolina. No entanto, tem sido reportada uma relação causal entre altos níveis de prolina e convulsões recorrentes em pacientes hiperprolinêmicos, o que sugere que altas concentrações de prolina podem predispor a convulsões (Flynn et al., 1989). Neste contexto, dados na literatura mostram que a administração subcutânea ou intracerebral de prolina em ratos prejudica a formação da memória e aprendizado (Moreira et al., 1989; Cherkin et al., 1976), o que pode refletir os efeitos neurotóxicos da prolina e as conseqüências funcionais das alterações fisiopatológicas que ocorrem no cérebro destes animais (Olton e Markowska, 1994).

O papel da prolina sobre a função do SNC é incerto. Porém, manifestações neurológicas encontradas em pacientes hiperprolinêmicos sintomáticos, aliadas ao aparente papel que elevados níveis de prolina exercem no SNC, ativando receptores do glutamato (Ault et al., 1987; Henzi et al., 1992; Martin et al., 1992; Pace et al., 1992; Nistri e Morelli, 1978), apresentando transportadores próprios expressos principalmente em neurônios glutamatérgicos (Fremeau et al., 1992; Fremeau et al., 1996; Shafqat e Fremeau, 1995; Velaz-Faircloth et al., 1995; Fremeau et al., 1992; Nadler et al., 1992; Nadler e Cohen, 1995) e aparentemente modulando a neurotransmissão glutamatérgica, sugerem uma possível ação excitotóxica de altas

concentrações de prolina, o que parece contribuir para as disfunções neurológicas características de indivíduos com hiperprolinemia tipo II.

#### 1.3.2.4 Tratamento

Até o presente momento, parece não existir tratamento específico para as hiperprolinemias. De acordo com Phang e colaboradores (2001), o tratamento para pacientes com hiperprolinemia não é indicado, uma vez que estas desordens são consideradas condições benignas, provavelmente não causando doença. Por outro lado, Benson e Fensom (1985) acreditam que existem variantes nas hiperprolinemias, e defendem a idéia de tentar reduzir os níveis de prolina nos indivíduos afetados. Porém, a prolina é um aminoácido não essencial, sintetizado a partir de outros precursores. Além disso, a maioria das proteínas contém resíduos de prolina, o que torna a restrição dietética deste aminoácido difícil, resultando apenas em um modesto controle nos valores plasmáticos de prolina, não causando dano ao paciente e não provocando impacto nas manifestações clínicas da doença (Phang et al., 2001). Por outro lado, a literatura aponta que com a restrição de prolina não são atendidas as necessidades metabólicas, particularmente na infância, tornando este aminoácido insuficiente durante o crescimento (Phang et al., 1995).

#### **1.4 Modelo animal de hiperprolinemia tipo II**

O modelo animal de hiperprolinemia tipo II utilizado neste trabalho foi o mesmo utilizado em outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa e baseia-se no modelo experimental desenvolvido por Moreira e colaboradores (1989). O modelo tem como objetivo reproduzir, em ratos, níveis de prolina semelhantes àqueles encontrados em pacientes com hiperprolinemia tipo II (Phang et al., 2001).

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

Tem sido demonstrado que altas concentrações de prolina ( $\geq 100\mu\text{M}$ ) ativam receptores NMDA (Ault et al., 1987; Henzi et al., 1992; Martin et al., 1992; Pace et al., 1992), AMPA (Henzi et al., 1992) e glicina-sensível à estricnina (Henzi et al., 1992; Nistri e Morelli, 1978) em cérebro de ratos. Baseado nesta constatação e considerando que a prolina apresenta alta afinidade por transportadores  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  dependentes localizados no cérebro, especialmente em terminais glutamatérgicos (Fremeau et al., 1992; Fremeau et al., 1996; Shafqat e Fremeau, 1995; Velaz-Faircloth et al., 1995), propõe-se que a prolina atue como modulador da

neurotransmissão glutamatérgica, indicando assim sua possível ação excitotóxica quando em altas concentrações (Nadler, 1987; Cohen e Nadler, 1997).

Estudos realizados mostram que a prolina despolariza células hipocámpais piramidais da região CA1 (Nadler et al., 1989) e de neurônios da medula espinhal em ratos (Ault et al., 1987; Helm et al., 1990; Henzi e MacDermott, 1991), principalmente por ativação de receptores NMDA.

Por outro lado, estudos realizados em nosso laboratório mostraram que a administração de prolina diminui a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em cérebro de ratos (Pontes et al., 2001), o que, possivelmente, leva ao rompimento do gradiente iônico, o qual é necessário para a estimulação neural e potencialização da excitotoxicidade secundária (Lees, 1993).

Experimentos realizados em nosso grupo também mostraram que a prolina diminui *in vivo* e *in vitro* a atividade da enzima acetilcolinesterase em córtex cerebral de ratos, o que provavelmente possa ocorrer devido à formação de radicais livres, uma vez que o pré-tratamento com vitaminas E e C previniu este efeito (Delwing et al., 2003).

## **1.5 Radicais Livres**

### 1.5.1 Definição e generalidades

Nos átomos, os elétrons ocupam regiões do espaço conhecidas como orbitais ou níveis de energia, os quais apresentam diferentes estados energéticos. Cada orbital é

freqüentemente associado a uma determinada região do átomo e um orbital pode suportar no máximo dois elétrons com spins opostos. O spin é a propriedade do elétron de girar em torno do seu próprio eixo, o que produz um campo magnético em torno de si. Os elétrons são capazes de girar tanto no sentido horário ( $1/2$ ) quanto no sentido anti-horário ( $-1/2$ ), sendo que dois elétrons em um mesmo orbital devem possuir spins opostos, criando desta forma campos magnéticos opostos. Quando dois elétrons ocupam o mesmo orbital, dizemos que eles estão pareados e quando um elétron está sozinho em um orbital dizemos que está não pareado (Halliwell e Gutteridge, 1990).

Um radical livre, por sua vez, é definido como qualquer espécie capaz de uma existência independente, por mais breve que seja e que contenha um ou mais elétrons não pareados. São considerados exemplos de radicais livres os metais de transição como o ferro, cobre e manganês e o oxigênio molecular por possuir dois elétrons não pareados, localizados em diferentes orbitais e que possuem o mesmo número de spin (Halliwell e Gutteridge, 1984; Bergendi et al., 1999).

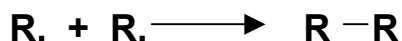
Dados na literatura citam o Dr. Comberg como um dos primeiros pesquisadores a referir-se aos radicais livres. Este fato ocorreu em 1900 quando ele descreveu a decomposição do hexa-feniletano em dois radicais trifenilmetil (Bergendi et al., 1999).

Em 1929, Paneth e Hofeditz descreveram a decomposição do tetrametil em radicais livres. A degradação de moléculas primárias em radicais livres necessita de grande quantidade de energia de ativação, já a decomposição subsequente requer pouca energia. Por sua vez, os radicais livres necessitam de pouca energia para iniciar as reações em cadeia (Bergendi et al., 1999).



Em 1930, Michaelis investigou a atividade dos radicais livres na área da bioquímica; logo depois, em 1940 foram descritos outros estudos de importância biológica, onde teve origem a técnica para “electron spin resonance” (ESR) e em 1962 foram desenvolvidas técnicas para o estudo de reações cinéticas envolvendo radicais livres (Bergendi et al., 1999).

Os radicais livres são capazes de reagir com outras moléculas de diversas maneiras. Um radical pode doar um elétron desemparelhado para outra molécula (radical redutor) ou pode receber um elétron de outra molécula estabilizando-o (radical oxidante). Porém, se um radical doar um elétron, receber um elétron ou unir-se por adição a um não-radical, este não-radical transforma-se em um radical. Deste modo, as reações de radicais livres com não-radicais têm por característica dar origem às reações em cadeia onde um radical a fim de se estabilizar, dá origem a outro radical e assim sucessivamente. As reações em cadeia são finalizadas somente quando dois radicais livres se encontram, uma vez que eles podem combinar seus elétrons sem par e se unir para formar uma ligação covalente (Halliwell e Gutteridge, 1999; Peres, 1994).



**Figura 5. Reação entre dois radicais livres - ligação covalente.**

### 1.5.2 Espécies Reativas do Oxigênio (ROS)

Através da cadeia de transporte de elétrons (cadeia respiratória), o oxigênio é reduzido à água por ação da citocromo oxidase mitocondrial (Marks et al., 1996).

Quando o oxigênio molecular for reduzido por um, dois ou três elétrons, formar-se-ão o radical ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, respectivamente. Ressaltando, os radicais livres são capazes de reagir com outras moléculas, extraíndo seus elétrons e produzindo novos radicais através das reações em cadeia (Bergendi et al., 1999).

O termo “espécies reativas do oxigênio” foi proposto porque existem espécies envolvidas nas reações de radicais que não possuem número ímpar de elétrons ou elétrons desemparelhados. Porém, sua ação pode ser tão prejudicial quanto a ação dos radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 1999).

O radical ânion superóxido contém três elétrons no orbital ( $\pi^*$ , 2p) e quando dissolvido em solventes orgânicos, torna-se extremamente reativo. É considerado um radical altamente reativo, porém possui solubilidade limitada em lipídios (Marks et al., 1996). Este radical é formado pela redução do oxigênio molecular por apenas um elétron, mediante aporte de energia. Por ser um radical livre e, por conseguinte, muito reativo, deve ser removido rapidamente dos tecidos pela reação de dismutação, realizada pela enzima superóxido dismutase, em que dois ânions superóxido reagem entre si; sendo um oxidado a oxigênio e o outro reduzido a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Bergendi et al., 1999; Halliwell e Gutteridge, 1984).

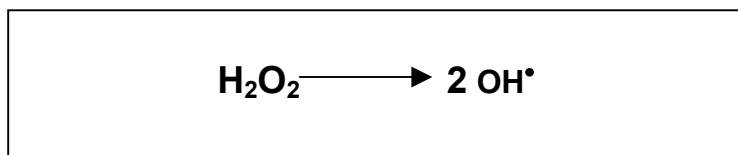
O ânion superóxido ( $O_2^-$ ) é formado em quase todas as células aeróbias (Fridovich, 1975; Fridovich, 1978; Halliwell e Gutteridge, 1984). Alguns superóxidos podem ser produzidos por “acidentes químicos”, em que muitas moléculas no organismo reagem diretamente com o oxigênio, como é o caso das catecolaminas, tetraidrofolatos e alguns constituintes da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Halliwell e Gutteridge, 1989; Liochev e Fridovich, 1994). O radical superóxido também pode ser proveniente da reação catalisada pela enzima xantina oxidase, responsável pela conversão de xantina em ácido úrico, e de outras flavoproteínas oxidases. (Robinson e Badwey, 1995). O superóxido pode ser protonado para formar  $HO_2^\bullet$ , o radical perhidroxil. Todavia, em pH fisiológico, predomina o  $O_2^-$  (Weiss, 1986).

A adição de um segundo elétron ao  $O_2^-$  leva à formação do íon peróxido ( $O_2^{2-}$ ), o qual não possui elétron não-pareado e por definição não é um radical. O  $O_2^{2-}$  formado em pH fisiológico é imediatamente protonado a  $H_2O_2$ . Em solução aquosa, o  $H_2O_2$  é formado a partir da reação de dismutação do  $O_2^-$  (Halliwell e Gutteridge, 1984).

O  $H_2O_2$ , por ser um agente oxidante, na presença de ferro ( $Fe^{2+}$ ) ou de outro metal de transição, ou através da reação com  $O_2^-$ , gera o radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ). Por esse motivo, as enzimas catalase e glutathione peroxidase têm como função remover rapidamente o  $H_2O_2$  (Marks et al., 1996; Halliwell e Gutteridge, 1989).

A adição de um elétron ao  $H_2O_2$  leva à formação do  $OH^\bullet$ , considerado um oxidante extremamente poderoso e capaz de reagir com quase todos os substratos biológicos (Wilson, 1979; Halliwell e Gutteridge, 1984). O  $OH^\bullet$  pode ser gerado, pelo menos, por dois mecanismos (Marshall e Bangert, 1995, Halliwell e Gutteridge, 1984):

- o primeiro é pela desintegração homolítica do  $\text{H}_2\text{O}_2$  por radiação:



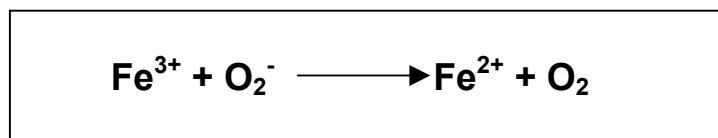
**Figura 6. Desintegração homolítica do peróxido de hidrogênio.**

- o segundo é através da reação com metais de transição (Reação de Fenton):



**Figura 7. Produção do radical hidroxila através da Reação de Fenton.**

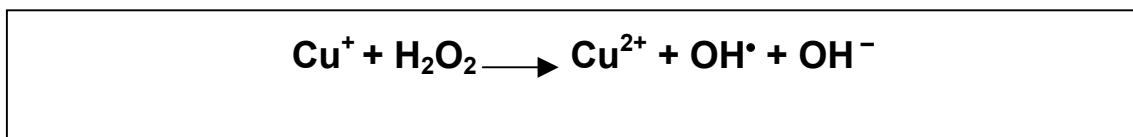
Na presença de pequenas quantidades de ferro, o  $\text{O}_2^-$  é capaz de reduzir o  $\text{Fe}^{3+}$  a oxigênio molecular e  $\text{Fe}^{2+}$ .



**Figura 8. Reação de redução do íon ferro.**

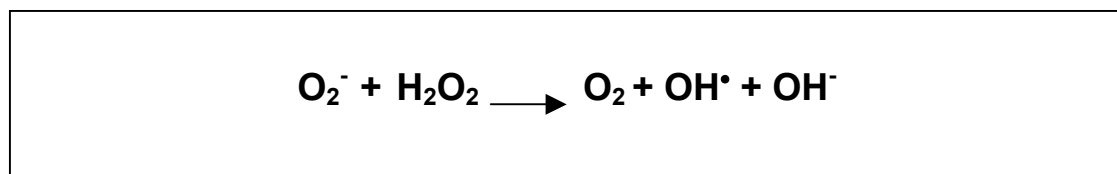
Para limitar a presença de ferro disponível e evitar a formação de radicais livres, o ferro é seqüestrado e transportado por uma variedade de proteínas, como a transferrina e a hemopexina; após, pelos receptores de transferrina, endossomas e por fim pela ferritina e hemosiderina (Marshall e Bangert, 1995).

O cobre também é capaz de reagir com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e originar o  $\text{OH}^\bullet$  (Halliwell e Gutteridge, 1984).



**Figura 9. Produção do radical hidroxila através da Reação de Fenton.**

O  $\text{OH}^\bullet$  também pode se formar pela reação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com o  $\text{O}_2^-$ , denominada reação de Haber-Weiss (Halliwell e Gutteridge, 1984).



**Figura 10. Produção do radical hidroxila através da Reação de Haber-Weiss.**

Outra ROS é o oxigênio *singlet*, o qual existe em dois estados: o *oxigênio  $\Delta$ -singlet* que possui elétrons pareados, com spins opostos, que se encontram em apenas um orbital, ficando o outro orbital desocupado; e o *oxigênio  $\sigma$ -singlet* que possui dois elétrons, que se encontram em diferentes orbitais, como no estado fundamental, mas com spins opostos (Bergendi et al., 1999).

O oxigênio *singlet* é capaz de oxidar muitas moléculas, incluindo membranas lipídicas. O oxigênio  $\Delta$ -*singlet* é mais comum porque é termodinamicamente mais

estável, enquanto que o oxigênio  $\sigma$ -*singlet* é rapidamente convertido ao  $\Delta$ -*singlet* (Bergendi et al., 1999).

O oxigênio *singlet* é uma forma que sofreu um rearranjo de elétrons que permite que ele reaja com moléculas biológicas mais rapidamente do que o oxigênio “normal”. Esta espécie se encontra em um estado de maior energia do que o oxigênio molecular, e pode ser formada pela reação entre o ânion hipoclorito e o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pela reação de Haber Weiss e através do radical  $\text{O}_2^-$  e  $\text{OH}^\bullet$  (Peres, 1994; Bergendi et al., 1999).

O ânion hipoclorito também é considerado um poderoso agente oxidante e é produzido pelas células fagocitárias através da ação da enzima mieloperoxidase (Weiss, 1986).

As ROS podem reagir com outros átomos ou moléculas e dar origem aos radicais alcoxil e peroxil em lipídios (Bergendi et al., 1999).

### 1.5.3 Espécies Reativas do Nitrogênio (RNS)

O termo espécies reativas do nitrogênio engloba o radical óxido nítrico (NO), o ânion peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e os íons nitrosônio ( $\text{NO}^+$ ) e nitroxila ( $\text{NO}^-$ ) (Bergendi et al., 1999).

Em 1992, a revista “Science” fez referência ao NO como sendo “a molécula do ano”.

O NO é formado em todas as células do SNC pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Essa reação enzimática requer L-arginina, oxigênio molecular e

NADPH como co-substratos. Os cofatores envolvidos nesta reação são flavina adenina dinucleotídio (FAD), flavina mononucleotídio (FMN) e tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>); e os grupos prostéticos são a calmodulina e o heme (Knowles, 1997; Lincoln et al., 1997).

O NO é um radical livre e em muitos sistemas biológicos possui tempo de meia-vida curto, devido à sua reatividade com outros constituintes intracelulares, como o O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Beckman et al., 1993). A reação entre o NO e o O<sub>2</sub><sup>-</sup> resulta na formação de ânion peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Esta reação é extremamente favorável, uma vez que o NO compete efetivamente com a enzima superóxido dismutase pelo O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Beckman et al., 1993; Lipton et al., 1993).

A formação do ONOO<sup>-</sup> a partir de NO e O<sub>2</sub><sup>-</sup> é três vezes mais rápida que a reação catalisada pela superóxido dismutase, enzima responsável pela dismutação do O<sub>2</sub><sup>-</sup> em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Radi et al., 1991). O ONOO<sup>-</sup> é formado em meio ácido, e posteriormente protonado a ácido peroxinítrico que, espontaneamente, forma o OH<sup>•</sup>, o qual é um radical extremamente citotóxico. Os produtos finais desta reação são os nitratos (Bergendi et al., 1999).

O ONOO<sup>-</sup> é considerado um potente oxidante e é capaz de reagir prontamente com sulfidrilas (Radi et al., 1991).

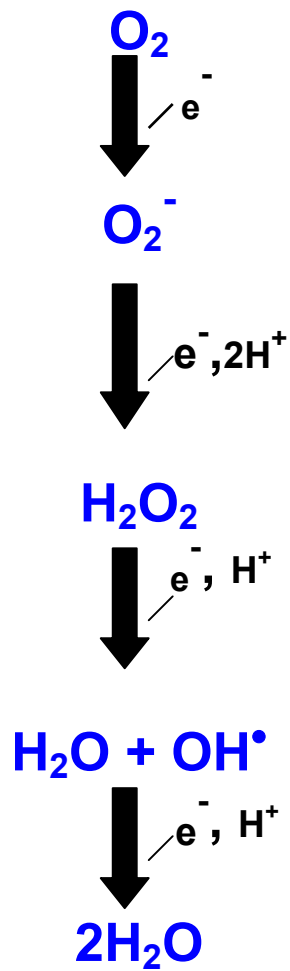
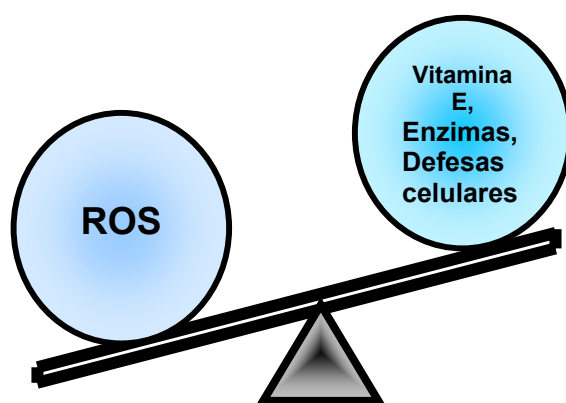


Figura 11: Formação de ROS a partir do oxigênio molecular (adaptado de Marks et al., 1996).



## 1.6 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo foi definido em 1991 como “um distúrbio do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante em favor do pró-oxidante, levando ao dano potencial” (Halliwell e Gutteridge, 1999) (Figura 12).



**Figura 12. Estresse oxidativo x mecanismos de defesa (adaptado de Marks et al., 1996).**

Em princípio, o estresse oxidativo pode resultar de uma diminuição dos antioxidantes e/ou da produção aumentada de ROS/RNS. A diminuição dos antioxidantes pode ser causada pela diminuição da atividade das enzimas de defesa antioxidante [cobre-zinco superóxido dismutase (CuZnSOD), manganês superóxido dismutase (MnSOD), catalase (CAT) ou glutathiona peroxidase (GSH-Px)] ou pela deficiência nutricional de antioxidantes e/ou outros constituintes dietéticos essenciais (alfa-tocoferol, ácido ascórbico, aminoácidos contendo enxofre necessário para a síntese de glutathiona, ou riboflavina, necessária para a produção de FAD, um cofator

da glutathione redutase). A produção aumentada de ROS/RNS pode ser causada pela exposição elevada ao oxigênio, pela presença de toxinas que são metabolizadas para produzir ROS/RNS, ou pela excessiva ativação de sistemas “naturais” de produção de ROS/RNS (ativação inapropriada de células fagocíticas em doenças inflamatórias crônicas, como na artrite reumatóide e colite ulcerativa) (Halliwell e Gutteridge, 1999).

### 1.6.1 Mecanismos de Dano Celular por Estresse Oxidativo

#### 1.6.1.1 Lipoperoxidação

A lipoperoxidação é um processo fisiológico que ocorre nas membranas celulares. Além de ser um fator de renovação da membrana, este processo é essencial na síntese de prostaglandinas e leucotrienos, bem como na fagocitose e pinocitose (Halliwell, 1992).

Membranas celulares e organelas subcelulares são particularmente sensíveis ao dano oxidativo devido à presença de ácidos graxos poliinsaturados em suas membranas fosfolipídicas (Weiss, 1986).

O  $\text{OH}^\bullet$  é provavelmente o mais potente das ROS e possui a habilidade de reagir com uma ampla variedade de constituintes celulares. É o provável iniciador das reações em cadeia a partir do ataque a membranas lipídicas, fato conhecido como peroxidação lipídica (Marshall e Bangert, 1995). A iniciação da peroxidação lipídica pode ocorrer também na presença de radicais peroxil, alcoxil e perhidroxil (Cheeseman, 1993).

A peroxidação lipídica, classicamente se procede em três etapas: iniciação, propagação e terminação.

Nas reações de *iniciação*, ocorre a remoção do átomo de hidrogênio do ácido graxo alvo para formar um radical lipídico ( $L^{\bullet}$ ). O produto da reação, agora contendo um elétron não pareado no carbono, reage com o oxigênio para formar o radical peroxil ( $LOO^{\bullet}$ ), o qual é capaz de reagir com outros ácidos graxos poliinsaturados e dar origem a uma nova cadeia de oxidação, formando assim o lipídio hidroperóxido ( $LOOH$ ). Este, por sua vez, geralmente é considerado o produto primário da peroxidação lipídica. A iniciação de uma nova cadeia a partir de radicais peroxil é definida como o estado de *propagação* da peroxidação lipídica. Os hidroperóxidos não são tão estáveis e são particularmente instáveis na presença de metais de transição como o ferro e o cobre. Os sais ferrosos reagem rapidamente com os lipídios hidroperóxidos para gerar radicais alcóxil e os sais férricos para dar origem aos radicais peroxil. Os íons metálicos conduzem à desintegração dos hidroperóxidos, levando à geração de espécies de radicais livres capazes de iniciarem novas cadeias de peroxidação lipídica. A decomposição dos hidroperóxidos na presença de íons ferro ou cobre leva à formação de aldeídos citotóxicos, como o malondialdeído, o qual é capaz de modificar quimicamente as proteínas e o DNA. Por fim, as reações de *terminação* têm como objetivo formar um produto estável, o que ocorre quando dois radicais livres reagem entre si, anulando seus elétrons solitários (Cheeseman, 1993; Marshall e Bangert, 1995; Boveris, 1998).

### 1.6.1.2 Dano às Proteínas

O ataque dos RL às proteínas causa, principalmente, a oxidação de grupamentos sulfidril e metionil, formando ligações cruzadas entre proteínas, o que leva à desnaturação (Webster e Nunn, 1988). Nas proteínas, os aminoácidos prolina, histidina, arginina, cisteína e metionina são suscetíveis ao ataque do  $\text{OH}^\bullet$  e ao dano oxidativo. A oxidação destes aminoácidos nas proteínas resulta em fragmentação protéica e suscetibilidade à digestão proteolítica (Marks et al., 1996). O ataque das RNS sobre a tirosina tem como produto a nitrotirosina, que pode ser detectada em lesões ateroscleróticas (Halliwell e Gutteridge, 1999).

### 1.6.1.3 Dano ao DNA

O aumento de ROS/RNS pode causar dano ao DNA através do ataque químico direto (como por exemplo, a ação das ROS sobre as bases do DNA) e/ou através de mecanismos indiretos (como por exemplo, a ação das ROS sobre enzimas que replicam ou reparam o DNA). Todavia, quando o  $\text{O}_2^-$ , o NO ou o  $\text{H}_2\text{O}_2$  se encontram em níveis fisiológicos, estes não reagem com as bases do DNA ou do RNA, ou com a ribose ou desoxirribose em razões significativas. Em relação ao  $\text{OH}^\bullet$ , este na presença do DNA, é capaz de gerar vários produtos, uma vez que ele ataca açúcares, purinas e pirimidinas (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A literatura descreve que as ROS, bem como as RNS estão envolvidas no desenvolvimento do câncer, não apenas por exercerem efeitos diretos ao DNA, mas

também por afetarem a transdução de sinais, a proliferação celular, a comunicação intracelular e por causar morte celular (Halliwell e Gutteridge, 1999).

#### 1.6.2 Sistema de Defesa Antioxidante

O organismo possui mecanismos de defesa contra a ação tóxica dos radicais livres e ROS, diminuindo ou eliminando as conseqüências negativas de seus efeitos no organismo.

O sistema de proteção que diminui a influência negativa de ROS no organismo compreende:

A) compostos que catalisam a remoção de radicais livres e outras “espécies reativas” – por exemplo: superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e antioxidantes-tióis-específicos,

B) proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes como os íons ferro, cobre e o heme – por exemplo: transferrinas, haptoglobulinas, hemopexina. Este grupo inclui a ceruloplasmina, que tem como função oxidar os íons ferrosos,

C) proteínas que protegem biomoléculas contra o dano,

D) agentes de baixo peso molecular que removem ROS/RNS – por exemplo: glutathione, ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol e provavelmente bilirrubina e ácido úrico (Halliwell e Gutteridge, 1999; Bergendi et al., 1999).

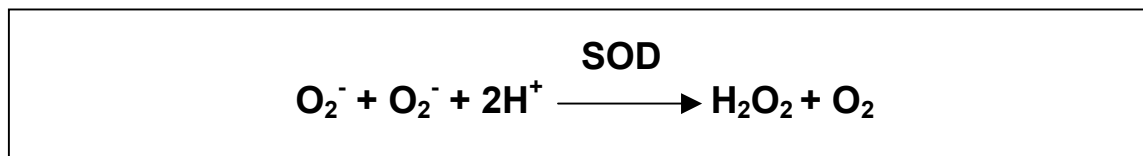
As defesas celulares localizam-se dentro das células, nos compartimentos hidrofílicos e hidrofóbicos. A maioria das enzimas citoprotetoras localiza-se dentro das

células e os antioxidantes são encontrados nos meios intra e extracelulares (Marshall e Bangert, 1995).

#### 1.6.2.1 Enzimas Antioxidantes

##### SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A enzima SOD tem como função catalisar a dismutação de íons superóxido em oxigênio e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fridovich, 1975).



**Figura 13. Reação de dismutação do radical superóxido.**

Existem três tipos de SOD de acordo com os metais localizados no sítio ativo: as que contêm cobre e zinco (CuZn-SOD), manganês (Mn-SOD) e ferro (Fe-SOD) no sítio ativo (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A) CuZn-SOD: São constituídas por duas subunidades protéicas, as quais contêm no sítio ativo um íon cobre e um íon zinco. Localizam-se em todas as células eucarióticas, sendo que nas células animais, a enzima se localiza no citosol e em menor proporção nos lisossomas, núcleo e no espaço entre a membrana mitocondrial

interna e externa. A CuZnSOD também se encontra nos peroxissomas. Possui estabilidade ao calor, ao ataque de proteases e à desnaturação.

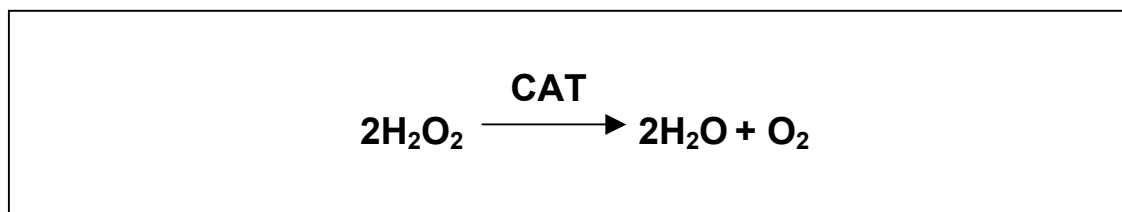
B) Mn-SOD: São constituídas por quatro subunidades protéicas, contendo usualmente um íon manganês por subunidade e localizam-se na matriz mitocondrial.

C) Fe-SOD: Geralmente são constituídas por duas subunidades protéicas, as quais contêm um ou dois íons ferro por molécula de enzima e localizam-se em bactérias, algas e plantas.

#### CATALASE (CAT)

A reação de dismutação do  $O_2^-$  gera o  $H_2O_2$ , que deve ser rapidamente removido do organismo. A remoção desta ROS é feita por ação de duas enzimas (CAT e glutathiona peroxidase).

A CAT catalisa a decomposição do  $H_2O_2$  em duas moléculas de água e uma de oxigênio. É constituída por quatro subunidades protéicas, contendo um grupo-férrico-heme ligado ao sítio ativo e localiza-se principalmente nos peroxissomas, e em menor quantidade no citosol e fração microssomal da célula (Aebi, 1984; Halliwell e Gutteridge, 1999; Marks et al., 1996).



**Figura 14. Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima catalase.**

## GLUTATIONA PEROXIDASE (GSH-Px)

A GSH-Px foi descoberta como uma enzima que, semelhante a CAT, metaboliza o  $H_2O_2$ . Localiza-se em todos tecidos animais e é considerada o maior sistema de proteção contra a peroxidação lipídica induzida. A enzima é constituída por quatro subunidades protéicas e contém um átomo de selênio no sítio ativo (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A GSH-Px catalisa a redução do  $H_2O_2$  e também de lipídios peróxidos (LOOH).

A glutationa (GSH) é um importante tripeptídeo e se localiza em elevadas concentrações em muitos tecidos, porém no cérebro esse tripeptídeo se encontra em baixas concentrações. A GSH tem como função proteger o organismo contra o estresse oxidativo, uma vez que atua na remoção de radicais livres e é o substrato para a GSH-Px (Boyland e Chasseaud, 1970). Os grupamentos sulfidríla da GSH doam seus elétrons e são oxidados a dissulfeto (GSSG) durante a reação. A glutationa redutase (GR) é responsável pela redução do dissulfeto formado, a fim de originar novamente a forma reduzida. Os elétrons necessários para a reação são provenientes do NADPH, o qual é gerado pela rota pentose-fosfato (Halliwell e Gutteridge, 1999; Marks et al., 1996; Wendel, 1981).

Existem dois tipos de GSH-Px, uma que utiliza o selênio como cofator e que se encontra na mitocôndria e no citosol da célula e outra que não depende de selênio, que se encontra somente no citosol e que é responsável pela metabolização de hidroperóxidos orgânicos (Mills, 1960; Maiorino et al., 1990).





Figura 15. Reação catalisada pela enzima glutatona peroxidase. Outros hidroperóxidos podem ser utilizados como substrato da reação.

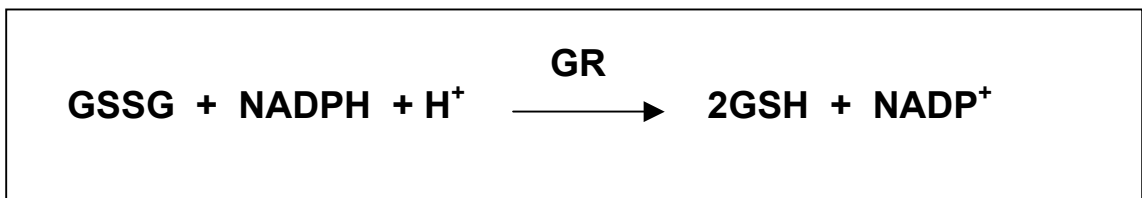


Figura 16. Reação de redução da glutatona pela glutatona redutase.

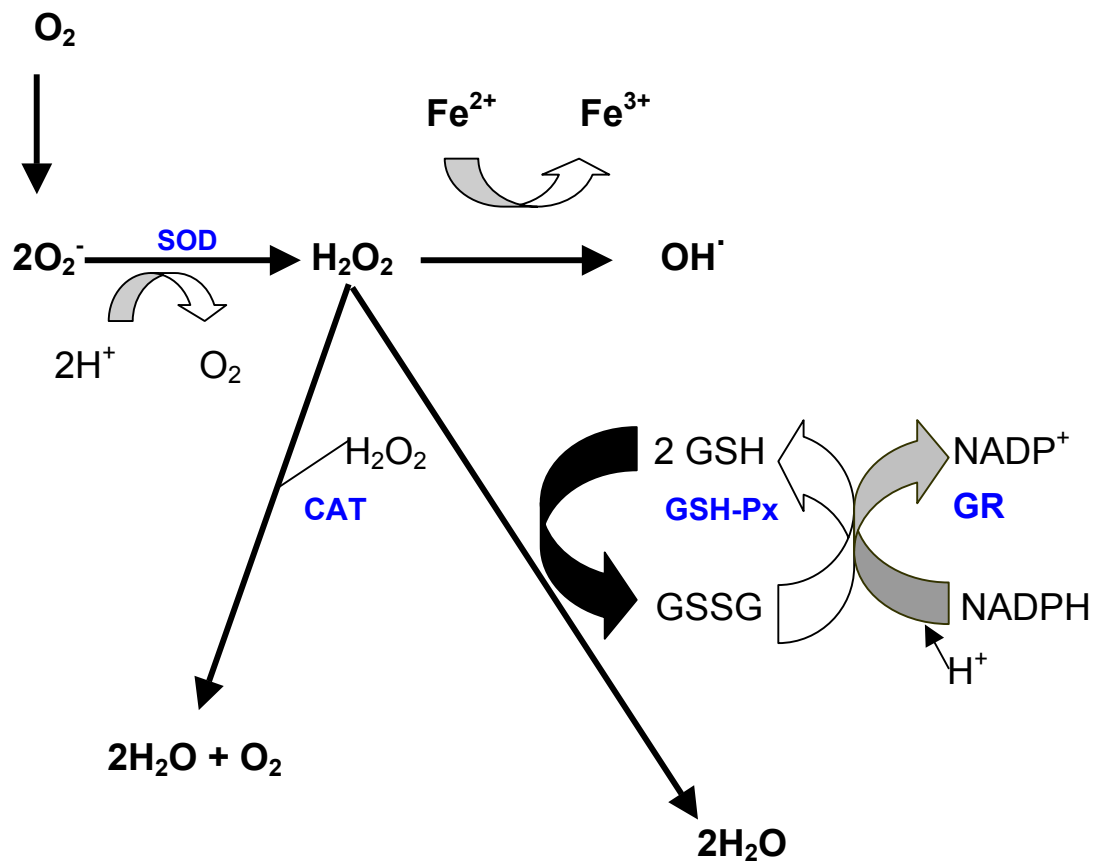


Figura 17. Redução do oxigênio à água (adaptado de Marks et al., 1996).

### 1.6.2.2 Vitaminas Antioxidantes

#### ÁCIDO ASCÓRBICO

O ácido ascórbico (vitamina C) é considerado um importante antioxidante, pois é capaz de reagir rapidamente com muitas ROS/RNS, especialmente com o radical

peroxil, levando à formação de um radical menos reativo: o radical semideidroascorbato, o qual pode ser regenerado a ascorbato através de um sistema enzimático (Bergendi et al., 1999).

O ascorbato é um importante antioxidante na ausência de metais de transição, enquanto que na presença destes, possui propriedades pró-oxidantes (Bergendi et al., 1999).

#### $\alpha$ -TOCOFEROL

O  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) é o mais potente antioxidante e possui a propriedade de finalizar a propagação de reações dos radicais livres nas membranas lipídicas, uma vez que forma um radical livre estável ( $\alpha$ -tocoferol -O•). Este radical é pouco reativo e não ataca os ácidos graxos. Tem sido sugerido que o  $\alpha$ -tocoferol -O• migra para a superfície da membrana para ser reoxidado a  $\alpha$ -tocoferol pela ação do ácido deidroascórbico. Outros contribuintes importantes para a reoxidação do radical  $\alpha$ -tocoferol são a GR e o ubiquinol (Marshall e Bangert, 1995; Marks et al., 1996).

#### $\beta$ -CAROTENO

O  $\beta$ -caroteno é também considerado um antioxidante, auxiliando desta forma na remoção de radicais livres. Embora grande parte do  $\beta$ -caroteno seja convertida em vitamina A nas células da mucosa intestinal, os carotenóides também são absorvidos

e podem proteger os lipídios contra a peroxidação, por reagirem com os radicais alcóxil e peróxil (Marshall e Bangert, 1995; Marks et al., 1996). O  $\beta$ -caroteno é capaz de inativar moléculas eletronicamente excitadas através do processo de quenching (quando a substância é capaz de absorver a energia de excitação dos radicais, neutralizando-os). Assim sendo, os carotenóides podem fazer quenching de oxigênio *singlet* (Krinsky, 1989).

### **1.7 Estresse oxidativo e Doenças neurodegenerativas**

O estresse oxidativo pode resultar em adaptação ou injúria celular. Na adaptação, as células podem tolerar um grau leve de estresse oxidativo, o que, freqüentemente, resulta na regulação dos sistemas de defesa antioxidante com o objetivo de restabelecer o equilíbrio oxidante/antioxidante. A injúria celular é definida como “o resultado de um estímulo químico ou físico” que, em excesso ou deficiente, é capaz de alterar provisoriamente ou permanentemente a homeostasia da célula. A resposta à injúria celular pode ser reversível, este processo ocorre quando a célula entra em um prolongado e temporário “*steady-state*” que não conduz à morte celular. Porém, em alguns casos pode resultar em dano irreversível (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A célula quando exposta a um grau severo de estresse oxidativo pode sofrer danos severos levando-a à morte. A ativação excessiva da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) leva à depleção dos níveis intracelulares de  $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ , de

forma que a célula não consegue mais produzir ATP e acaba morrendo. Este efeito muitas vezes é chamado de “suicide response”, visto que o reparo do DNA não é eficiente, assim ocorrerá morte celular, para que esta não se torne uma célula cancerosa. A morte celular resulta principalmente de dois mecanismos: necrose e apoptose (Halliwell e Gutteridge, 1999).

O estresse oxidativo pode causar dano em diferentes tipos de biomoléculas, incluindo o DNA, proteínas e lipídios (Halliwell e Gutteridge, 1999).

O estresse oxidativo é um importante processo que vem sendo relatado na patogênese de algumas condições que afetam o SNC, tais como epilepsia, esclerose múltipla, demência e doenças de Alzheimer e Parkinson (Halliwell e Gutteridge, 1985; Reznick e Packer, 1993). Este fato torna-se facilmente compreensível, visto que o SNC é altamente sensível ao estresse oxidativo, em face ao alto consumo de oxigênio; ao alto conteúdo lipídico, principalmente de ácidos graxos poliinsaturados, os quais servem de substrato para a peroxidação lipídica; aos altos níveis de ferro, os quais favorecem a lipoperoxidação; e à baixa defesa antioxidante (Halliwell, 1996).

De acordo com Marshall e Bangert (1995) muitas doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer e Parkinson, apresentam níveis elevados de ferro. Na doença de Parkinson, os elevados níveis de ferro reagem com o  $H_2O_2$  levando à geração do  $OH^\bullet$ . O  $OH^\bullet$  pode oxidar lipídios, proteínas e atuar sobre as bases do DNA (Jenner, 1994). Riobo e colaboradores (2002) propõem um papel direto do NO, e de seu produto peroxinitrito, na fisiopatologia da doença de Parkinson.

Deve-se ressaltar também que com o avanço da idade a eficiência da cadeia de transporte de elétrons diminui, o que acarreta um aumento na produção de ROS,

como, por exemplo, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o  $\text{O}_2^-$ . Estes, por sua vez, podem desencadear a produção de espécies reativas, como o  $\text{OH}^\bullet$  e o peroxinitrito, os quais danificam proteínas celulares, lipídios e o DNA (Cassarino e Bennett Jr., 1999).

Evidências na literatura mostram que pacientes com fenilcetonúria, um EIM, apresentam um aumento na formação de radicais livres no sangue (Vilaseca et al., 1997). Por outro lado, estudos realizados no nosso grupo mostraram que modelos químicos experimentais de hiperargininemia (Wyse et al., 2001), fenilcetonúria (Hagen et al., 2002) e homocistinúria (Streck et al., 2003) em ratos aumenta a formação de radicais livres e diminui a capacidade antioxidante, o que sugere uma indução do estresse oxidativo.

## 2. OBJETIVOS

Considerando que o atual mecanismo aceito para morte neuronal depende, pelo menos em parte, da formação de radicais livres, que a prolina ativa receptores NMDA o que pode levar à formação de radicais livres e que pacientes com hiperprolinemia tipo II apresentam disfunção neurológica, este trabalho teve como objetivos:

- Avaliar alguns parâmetros de estresse oxidativo (quimiluminescência e TRAP) em córtex cerebral de ratos submetidos à administração aguda e crônica de prolina;
- Verificar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de prolina sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo (quimiluminescência e TRAP) em córtex cerebral de ratos.
- Avaliar as atividades das enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase) em córtex cerebral de ratos submetidos à administração aguda e crônica de prolina;
- Verificar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de prolina sobre as atividades das enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase) em córtex cerebral de ratos.

### 3. ARTIGOS

#### **Proline induces oxidative stress in cerebral cortex of rats**

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

International Journal of Developmental Neuroscience, 21: 105-110, 2003.



***In vivo* and *in vitro* effects of proline on some parameters of oxidative stress in rat brain**

Daniela Delwing, Caren S. Bavaresco, Fábria Chiarani, Clóvis M.D. Wannmacher,  
Moacir Wajner, Carlos S. Dutra-Filho, Angela T.S. Wyse.  
Brain Research, 991: 180-186, 2003.

#### 4. DISCUSSÃO

Hiperprolinemia tipo II é uma doença autossômica recessiva do metabolismo da prolina causada pela deficiência severa na atividade da enzima  $\Delta^1$ -pirrolino-5-carboxilato-desidrogenase, o que resulta no acúmulo tecidual de prolina (Phang et al., 2001).

Embora não esteja bem definido se a hiperprolinemia tipo II é uma desordem benigna ou uma doença que afeta o SNC, verifica-se que alguns pacientes com quadro bioquímico de hiperprolinemia tipo II apresentam os sintomas neurológicos da doença, como retardo mental e epilepsia, enquanto que outros pacientes são clinicamente normais (Phang et al., 2001). Os níveis plasmáticos de prolina encontram-se elevados em ambos os pacientes, o que indica que altos níveis de prolina não são suficientes para causar dano neurológico. Por outro lado, a literatura correlaciona os altos níveis de prolina encontrados nos pacientes hiperprolinêmicos com manifestações neurológicas, sugerindo que elevadas concentrações de prolina podem predispor a convulsões (Flynn et al., 1989). A alta incidência de convulsões durante a infância na hiperprolinemia tipo II pode ser explicada pelo fato da prolina possuir propriedades neuroexcitatórias e neurotóxicas (Flynn et al., 1989).

Dados na literatura mostram que a administração aguda subcutânea ou intracerebral de prolina em ratos causa alterações na formação da memória e no aprendizado (Cherkin et al., 1976; Moreira et al., 1989), o que pode refletir os efeitos neurotóxicos dos altos níveis de prolina no cérebro (Olton e Markowska, 1994). Uma

possível explicação para tais alterações seria o fato de que altos níveis deste aminoácido no SNC interferem na liberação do glutamato do neurônio, o que secundariamente poderia afetar o processo de memória. Também tem sido demonstrado que a liberação de glutamato durante a atividade neuronal está envolvida com os mecanismos de memória (Moreira et al., 1989).

Dados na literatura mostram que altas concentrações de prolina ( $\geq 100\mu\text{M}$ ) ativa receptores NMDA (Ault et al., 1987; Henzi et al., 1992; Martin et al., 1992; Pace et al., 1992), AMPA (Henzi et al., 1992) e glicina-sensível à estriquina (Henzi et al., 1992; Nistri e Morelli, 1978) em cérebro de ratos. Com base nesta afirmação e sabendo-se que a prolina tem alta afinidade por transportadores  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -dependentes, os quais são encontrados em neurônios glutamatérgicos (Fremeau et al., 1992; Fremeau et al., 1996; Nadler et al., 1992; Nadler e Cohen, 1995), propõe-se que a prolina atue como um modulador da neurotransmissão glutamatérgica.

Evidências também sugerem que a prolina pode ser considerada um possível neurotransmissor ou neuromodulador no SNC porque os terminais nervosos são capazes de sintetizar, acumular e liberar prolina, a qual possui ação neuronal seletiva e estereoespecífica (Ault et al., 1987). Níveis aumentados de prolina e de glutamato no líquido cérebro-espinhal de pacientes hiperprolinêmicos reforçam a possível ação excitotóxica da prolina quando em altas concentrações no cérebro (Van Harreveld e Fifkova, 1973; Rhoads et al., 1983; Phang et al., 2001).

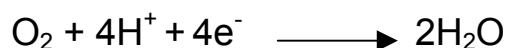
Alguns autores mostram que a prolina despolariza neurônios hipocâmpais em ratos por ativação de receptores glutamatérgicos, sugerindo que este aminoácido

pode prejudicar os neurônios do SNC através de mecanismos excitotóxicos (Nadler et al., 1988). Outros autores também mostram que a despolarização neuronal ocasionada pela prolina parece ocorrer, em parte, por ativação de receptores NMDA (Ault et al., 1987). A ação excitotóxica da prolina também tem sido associada com sintomas neuropsiquiátricos encontrados em pacientes com hiperprolinemia tipo II (Nadler et al., 1988).

Resultados obtidos em nosso laboratório têm mostrado que a prolina diminui as atividades das enzimas  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, acetilcolinesterase e creatina quinase em córtex cerebral de ratos (Pontes et al., 1999; Delwing et al., 2003; Kessler et al., 2003). Por outro lado, também mostramos que a administração de vitaminas E e C previniram a inibição das atividades das enzimas  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e acetilcolinesterase em cérebro de ratos submetidos à administração de prolina (Franzon et al., 2003, Delwing et al., 2003), o que sugere o envolvimento dos radicais livres nestas inibições.

O radical livre é definido como um átomo ou molécula que contém um ou mais elétrons não pareados e que existe independentemente. Os radicais livres são altamente reativos e podem iniciar as reações em cadeia através da extração de elétrons de moléculas com o objetivo de se tornarem estáveis (Bergendi et al., 1999; Bowling e Beal, 1995; Marks et al., 1996).

Na cadeia de transporte de elétrons, o oxigênio é reduzido à água por ação da enzima citocromo oxidase. Esta reação necessita de quatro elétrons para ser executada.



Porém, quando o oxigênio molecular for reduzido por um, dois ou três elétrons, ocorrerá a formação do radical  $O_2^-$ , do  $H_2O_2$  e do  $OH^\bullet$ , respectivamente. O  $OH^\bullet$  é considerado altamente reativo e também pode ser gerado quando o  $H_2O_2$  entra em contato com íons cobre e íons ferro (Bergendi et al., 1999).

A ação tóxica das ROS é neutralizada por uma ampla variedade de enzimas antioxidantes, as quais limitam o dano causado por estas espécies (Marshall e Bangert, 1995). As principais defesas enzimáticas contra as ROS são a SOD, enzima responsável pela reação de dismutação do  $O_2^-$  e considerada a primeira defesa contra o estresse oxidativo e as enzimas CAT e GSH-Px, as quais são responsáveis pela remoção do  $H_2O_2$  gerado na remoção do  $O_2^-$ . Deve-se ressaltar que o  $H_2O_2$  deve ser rapidamente removido para impedir a formação do  $OH^\bullet$ . Os principais antioxidantes não enzimáticos são a vitamina E, vitamina C, GSH e possivelmente os carotenóides – todos capazes de finalizar as reações dos radicais livres (Marks et al., 1996).

O estresse oxidativo ocorre quando as ROS produzidas excedem a capacidade de remoção realizada pelo mecanismo de defesa celular, o qual inclui as enzimas antioxidantes e os antioxidantes não enzimáticos (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Conforme a literatura, todos os organismos aeróbicos podem sofrer dano oxidativo, porém, o tecido nervoso é mais suscetível devido ao alto consumo de oxigênio, à alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados, à baixa defesa antioxidante e aos altos níveis de ferro (Halliwell e Gutteridge, 1999; Halliwell, 1996).

O envolvimento dos radicais livres e do estresse oxidativo na fisiopatologia de várias situações que comprometem o SNC vem sendo cada vez mais estudado. Neste contexto, o aumento dos radicais livres tem sido associado a doenças

neurodegenerativas, tais como, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, demência, isquemia cerebral e epilepsia (Bondy, 1996; Delanty e Dichter, 1998). Evidências também sugerem que em muitas doenças neurodegenerativas, como, por exemplo, na doença de Parkinson, existe um acúmulo de ferro secundário a lesão inicial, o qual pode estar envolvido na geração de ROS (Marshall e Bangert, 1995).

Os modelos animais de EIM embora incapazes de mimetizar completamente uma doença humana, dão uma idéia do quadro clínico apresentado durante a sua instalação e desenvolvimento. A possibilidade de isolar cada etapa das alterações metabólicas para estudá-las, comparando a um controle, parece ser a principal vantagem destes modelos.

As aminoacidopatias e as acidemias orgânicas parecem ser os EIM mais freqüentes. Em nosso laboratório desenvolvemos modelos químicos experimentais pós-natais para a fenilcetonúria, hiperprolinemia tipo II, metilmalonicacidemia e propionicacidemia a partir de parâmetros farmacocinéticos de fenilalanina, prolina, ácidos metilmalônico e propiônico, respectivamente (Wyse et al., 1995; Moreira et al., 1989; Dutra et al., 1991).

No modelo experimental de hiperprolinemia tipo II, para atingir níveis séricos de prolina em ratos, similares àqueles encontrados em pacientes hiperprolinêmicos, foram administradas por via subcutânea, várias doses de prolina, as quais variavam de acordo com o peso e a idade dos ratos. Os animais controles receberam igual volume de solução salina 0,9% (1ml/100 g de peso corporal). As soluções foram administradas duas vezes ao dia, com intervalos de 10 horas. O esquema final para

administração crônica de prolina foi calculado de acordo com parâmetros farmacocinéticos da prolina (Moreira et al., 1989).

Os modelos químicos experimentais pós-natais, desenvolvidos em nosso laboratório, para fenilcetonúria, hiperprolinemia tipo II, metilmalonicacidemia e propionicacidemia (Wyse et al., 1995; Moreira et al., 1989; Dutra et al., 1991) demonstraram que ratos tratados quimicamente com estes aminoácidos ou ácidos orgânicos apresentaram diminuição na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Wyse et al., 1995; Wyse et al., 1998; Wyse et al., 2000, Pontes et al., 1999). Também foi mostrado que animais submetidos à administração de ácido metilmalônico apresentam déficit no metabolismo energético cerebral (Dutra et al., 1991) e que a administração crônica de prolina, ácido metilmalônico e ácido propiônico causaram alterações comportamentais em ratos (Moreira et al., 1989; Dutra et al., 1991; Brusque et al., 1999).

Estudos realizados recentemente em nosso laboratório mostraram que a administração de fenilalanina (Hagen et al., 2002), arginina (Wyse et al., 2001) e homocisteína (Streck et al; 2003) provocaram a indução do estresse oxidativo em cérebro de ratos. Outros investigadores também relataram alterações em alguns parâmetros de estresse oxidativo em pacientes fenilcetonúricos (Vilaseca et al., 1997).

No presente trabalho, primeiramente avaliamos alguns parâmetros de estresse oxidativo (quimiluminescência e TRAP) e as atividades das enzimas antioxidantes (CAT, GSH-Px e SOD) em ratos de 10 dias submetidos à administração aguda de prolina. Foram também estudados os efeitos *in vitro* da prolina sobre estes

parâmetros. Ressalta-se que as enzimas citadas acima são consideradas as principais defesas enzimáticas no cérebro e demais tecidos contra a geração de radicais livres.

Os resultados obtidos mostraram que a administração aguda de prolina aumentou 78% a quimiluminescência e reduziu 29% o TRAP em homogeneizado de córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade, sugerindo que a prolina induz a produção de radicais livres e compromete a capacidade antioxidante total do tecido nervoso. Por outro lado, não observamos alterações significativas nas atividades das enzimas CAT, GSH-Px e SOD em homogeneizado de córtex cerebral de ratos de 10 dias submetidos à administração aguda de prolina.

Nos experimentos *in vitro* observamos que a prolina nas concentrações de 0,5 e 1,0 mM aumentou significativamente a quimiluminescência (124% e 205%), respectivamente e reduziu o TRAP (33% e 61%), respectivamente. A prolina *in vitro* (0,5 e 1,0 mM) também reduziu significativamente a atividade da enzima SOD (34% e 27%), respectivamente, permanecendo as demais enzimas inalteradas. Neste caso, a inibição na atividade da SOD pela prolina em ratos de 10 dias pode ser devido a uma interação direta do aminoácido com a enzima, resultando desse modo em inibição da SOD. Ressalta-se também que as alterações obtidas nos parâmetros analisados foram dose dependente.

Posteriormente, avaliamos os mesmos parâmetros de estresse oxidativo acima citados em ratos de 29 dias submetidos à administração aguda e crônica de prolina. Para a realização do estudo crônico, utilizamos o modelo químico experimental de hiperprolinemia tipo II desenvolvido por Moreira e colaboradores (1989) onde a



administração de prolina inicia no 6° dia de vida, período em que o cérebro apresenta maturação equivalente à de um ser humano recém-nascido e finaliza no 28° dia de vida, período em que o cérebro apresenta maturação equivalente à de uma criança de dois a oito anos de vida (Loo et al., 1980). Também foram investigados os efeitos *in vitro* da prolina sobre os mesmos parâmetros em ratos de 29 dias. Salienta-se que estes experimentos visam estender nossos estudos anteriores. Foram utilizados ratos mais velhos porque as defesas antioxidantes são mais bem expressas, e também para poder avaliar os efeitos da administração crônica de prolina sobre as defesas antioxidantes não enzimáticas e enzimáticas em córtex cerebral de ratos.

Nossos resultados mostraram que no tratamento crônico, onde os animais foram tratados do 6° ao 28° dia de vida com duas injeções diárias de prolina e foram sacrificados 12 horas após a última injeção, não houve alterações nos parâmetros de estresse oxidativo testados: quimiluminescência e TRAP. Em contraste, a administração crônica de prolina aumentou significativamente a atividade da CAT (44%) e reduziu significativamente a atividade da GSH-Px (33%) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Porém, a atividade da SOD não foi alterada. O aumento na atividade da CAT após administração crônica de prolina pode ser consequência de uma adaptação enzimática, uma vez que a literatura descreve que as enzimas antioxidantes podem responder ao aumento do estresse oxidativo aumentando suas atividades, a fim de reduzir o dano (Travacio e Llesuy, 1996). Por outro lado, a redução na atividade da GSH-Px encontrada neste trabalho não é conhecida, mas uma possível explicação seria o fato de que a prolina poderia indiretamente diminuir a síntese ou aumentar a degradação da enzima.

Nossos resultados também mostraram que a administração aguda de prolina em ratos de 29 dias de idade aumentou significativamente a quimiluminescência (23%) e reduziu significativamente o TRAP (41%). Em relação às enzimas antioxidantes testadas, ocorreu redução significativa na atividade da CAT (43%), permanecendo as atividades das enzimas GSH-Px e SOD inalteradas. A redução da CAT *in vivo* sinaliza o efeito indireto da prolina sobre a atividade da enzima.

Uma possível explicação para os diferentes resultados da quimiluminescência e do TRAP encontrados em nosso trabalho é a presença da prolina, visto que na administração aguda da prolina os animais são sacrificados uma hora após a injeção e no tratamento crônico eles são sacrificados 12 horas após a última injeção.

Em relação aos experimentos *in vitro* realizados em ratos de 29 dias, verificamos um aumento significativo da quimiluminescência na concentração de 1,0 mM (100%) e uma redução significativa do TRAP nas concentrações de 0,5 e 1,0 mM (37% e 59%), respectivamente. Quanto às enzimas antioxidantes analisadas, não observamos alterações nas atividades das mesmas.

Considerando que a quimiluminescência é um método de medida de peroxidação lipídica, o qual é induzido por formação de radicais livres e que o TRAP mede a defesa antioxidante total não enzimática tecidual, pode-se sugerir que a prolina induz a produção de radicais livres e compromete a capacidade antioxidante total do tecido nervoso. Uma vez que o estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes, a alteração de ambos os parâmetros é um importante indicativo de que a prolina induz o estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos.

Considerando que as concentrações de prolina utilizadas em nossos experimentos são semelhantes às encontradas em pacientes hiperprolinêmicos, nossos resultados sugerem que a indução do estresse oxidativo em cérebro de ratos causada pela prolina pode, possivelmente, representar um dos mecanismos pelos quais ocorre dano cerebral nos pacientes hiperprolinêmicos.

## 5. CONCLUSÕES

1) Os animais submetidos à administração aguda de prolina apresentaram um aumento significativo na quimiluminescência e uma redução significativa no TRAP em córtex cerebral de ratos de 10 e 29 dias.

2) Não houve alteração significativa na quimiluminescência e no TRAP em córtex cerebral de ratos submetidos à administração crônica de prolina .

3) A prolina *in vitro*, nas concentrações de 0,5 e 1,0 mM, aumentou significativamente a quimiluminescência e reduziu significativamente o TRAP em córtex cerebral de ratos de 10 e 29 dias.

4) A administração aguda de prolina em ratos de 10 dias não apresentou alterações significativas nas atividades das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase). Porém, verificamos uma redução significativa na atividade da catalase em córtex cerebral de ratos de 29 dias.

5) Os animais submetidos à administração crônica de prolina apresentaram um aumento significativo na atividade da catalase e uma diminuição significativa na atividade da glutathione peroxidase, permanecendo inalterada a atividade da superóxido dismutase.

6) A prolina *in vitro*, nas concentrações de 0,5 e 1,0 mM, reduziu significativamente a atividade da superóxido dismutase em córtex cerebral de ratos de 10 dias. As atividades das enzimas catalase e glutathione peroxidase não foram alteradas. Porém, em ratos de 29 dias não observamos alterações significativas em nenhuma das enzimas antioxidantes testadas.

Os resultados obtidos em nosso trabalho indicam que o estresse oxidativo pode estar envolvido na etiopatogenia da hiperprolinemia tipo II. Acreditamos que o estresse oxidativo possa contribuir, pelo menos em parte, na compreensão da disfunção neurológica observada em pacientes hiperprolinêmicos tipo II.

## 6. PERSPECTIVAS

Nossos resultados abrem a perspectiva de continuarmos nossa investigação com os seguintes objetivos:

1) verificar o efeito *in vivo* e *in vitro* da prolina sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo (quimiluminescência, TRAP e TBA-RS) em plasma de ratos.

2) verificar o efeito *in vivo* e *in vitro* da prolina sobre as atividades das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) em eritrócitos de ratos.

3) verificar se o tratamento de antioxidantes (vitaminas E e C) previne o efeito da administração de prolina sobre o estresse oxidativo em córtex cerebral e/ou sangue de ratos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. Meth. Enzymol., 105: 121-126, 1984.
- APPLEGARTH, D.A., INGRAM, P.F., HINGSTON, J. and HARDWICK, D.F. Hyperprolinemia Type II. Clin. Biochem., 7: 14-28, 1974.
- AULT, B., WANG, C.M. and YAWN, B.C. L-Proline depolarizes rat spinal motoneurons by an excitatory amino acid antagonist-sensitive mechanism. Br. J. Pharmacol., 92: 319-326, 1987.
- 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.
- BONDY, S. Evaluation of free radical-initiated oxidant events within the nervous system. In Perez-Polo, J.R. (Editor) Paradigms Neural Injury: San Diego: Academic Press, pp. 243-259, 1996.
- BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. Medicina (Buenos Aires), 58: 350-356, 1998.
- BOWLING, A.C. and BEAL, M.F. Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Life Sci., 56: 1151-1171, 1995.
- BOYLAND, E. and CHASSEAUD, L.F. The effect of some carbonyl compounds on rat liver glutathione levels. Biochem. Pharmacol., 19: 1526-1528, 1970.
- BRUSQUE, A.M., MELLO, C.F., BUCHANAN, D.N., TERRACCIANO, S.T., ROCHA, M.P., VARGAS, C.R., WANNMACHER, C.M. and WAJNER, M. Effect of chemically induced propionic acidemia on neurobehavioral development of rats. Pharmacol. Biochem. Behav., 64: 529-534, 1999.
- 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.
- CHEESEMAN, K.H. Lipid peroxidation and cancer. In: Halliwell, B. and Aruoma, O.I. DNA and Free Radicals, England: Ellis Horwood Limited, pp. 109-144, 1993.
- CHERKIN, A., ECKARDT, M.J. and GERBRANDT, L.K. Memory: proline induces retrograde amnesia in chicks. Science, 193: 242-244, 1976.
- COHEN, S.M. and NADLER, J.V. Sodium-dependent proline and glutamate uptake by hippocampal synaptosomes during postnatal development. Dev. Brain Res., 100: 230-233, 1997.
- DELANTY, N. and DICHTER, M.A. Oxidative injury in the nervous system. Acta Neurol. Scand., 98: 145-153, 1998.
- DELWING, D., CHIARANI, F., DELWING, D., BAVARESCO, C.S., WANNMACHER, C.M.D., WAJNER, M. and WYSE, A.T.S. Proline Reduces Acetylcholinesterase Activity in Cerebral Cortex of Rats. Metabolic Brain Disease, 18: 79-86, 2003.
- DUTRA, J.C., WAJNER, M., WANNMACHER, C.M., WANNMACHER, L.C., PIRES, R.F. and ROSA-JUNIOR, A. Effect of postnatal methylmalonate administration on adult rat behavior. Braz J. Med. Biol. Res., 24 (6): 595-605, 1991.
- EFRON, M.L. Familial hyperprolinemia. Report of a second case, associated with congenital renal malformations, hereditary hematuria and mild mental retardation, with demonstration of enzyme defect. N. Engl. J. Med., 272: 1243, 1965.
- EMERY, F.A., GOLDIE, L. and STERN, J. Hyperprolinaemia type II. J. Mental. Defic. Res., 12: 187-195, 1968.
- FLEMING, G.A., HAGEDORN, C.H., GRANDER, A.S. and PHANG, J.M. Pyrroline-5-carboxylate in human plasma. Metabolism, 33: 739-742, 1984.
- FLYNN, M.P., MARTIN, M.C., MOORE, P.T., STAFFORD, J.A., FLEMING, G.A. and PHANG, J.M. Type II hyperprolinaemia in a pedigree of Irish travellers (nomads). Arch. Dis. Child., 64: 1699-1707, 1989.
- FLYNN, N.E., MEININGER, C.J., HAYNES, T.E. and WU, G. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. Biomed. Pharmacother., 56: 427-438, 2002.



- FRANZON, R., LAMERS, M.L., STEFANELLO, F.M., WANNMACHER, C.M.D., WAJNER, M. and WYSE, A.T.S. Evidence that oxidative stress is involved in the inhibitory effect of proline on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in synaptic plasma membrane of rat hippocampus. Int. J. Dev. Neurosci., 2003 *in press*.
- FREMEAU, R.T., CARON, M.G. and BLAKELY, R.D. Molecular cloning and expression of a high affinity L-proline transporter expressed in putative glutamatergic pathways of rat brain. Neuron, 8: 915- 926, 1992.
- FREMEAU, R.T., VELAZ-FAIRCLOTH, M., MILLER, J.W., HENZI, V.A, COHEN, S.M., NADLER, J.V., SHAFQAT, S., BLAKELY, R.D. and DOMIN, B. A novel non-opioid action of enkephalins: competitive inhibition of the mammalian brain high affinity L-proline transporter. Mol. Pharmacol., 49:1033-1041, 1996.
- FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. Ann. Rev. Biochem., 44:147-159, 1975.
- FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. Science, 201: 875-880, 1978.
- GIUGLIANI, R. Erros inatos do metabolismo: uma visão panorâmica. Pediatria Moderna, Vol. XXIII. 1: 29-40,1988.
- GOODMAN, S.I., MACE, J.W., MILES, B.S., TENG, C.C. and BROWN, S.B. Defective hydroxyproline metabolism in type II hyperprolinaemia. Biochem. Med., 10: 329-336, 1974.
- HAGEN, M.E.K., PEDERZOLLI, C.D., SGARAGAVATTI, A.M., BRIDI, R., WAJNER, M., WANNMACHER, C.M.D., WYSE, A.T.S. and DUTRA-FILHO, C.S. Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. Biochim. Biophys. Acta., 1586: 344-352, 2002.
- HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. J. Biochem. 219: 1-14,1984.
- HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen radicals and nervous system. Trends Neurosci., 8: 22-26, 1985.
- HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C. In: Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: Clarendon Press, 2 nd. ed., 1989.
- HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Meth. Enzymol.,186: 1-63, 1990.

- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. J. Neurochem., 59: 1609-1623, 1992.
- 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, 3 th ed., pp. 246-349, 1999.
- HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C. Antioxidant defences. In: Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: Oxford University Press, 3 th ed., pp. 105-162, 1999.
- HELM, S.W., REICHLING, D.B. and MACDERMOTT, A.B. Proline: A potential excitotoxin in the mammalian central nervous system. Soc. Neurosci. Abstr., 16: 195, 1990.
- HENZI, V. and MACDERMOTT, A.B. Agonist action of L-proline at glutamate and glycine receptors. Soc. Neurosci. Abstr., 17: 72, 1991.
- HENZI, V., REICHLING, D.B., HELM, S.W. and MACDERMOTT, A.B. L-proline activates glutamate and glycine receptors in cultured rat dorsal horn neurons. Mol. Pharmacol., 41: 793-801, 1992.
- HOLTZMAN, N. Rare diseases, common problems: recognition and management. Pediatrics, 62: 1056-1060, 1978.
- JENNER, P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. The Lancet, 344: 796-798, 1994.
- KELLER, E., DAVIS, J.L., TACHIKI, K.H., CUMMINS, J.T. and BAXTER, C.F. L-proline inhibition of glutamate release: Possible involvement in memory formation. J. Neurochem., 37: 1335-1337, 1981.
- KESSLER, A., COSTABEBER, E., DUTRA-FILHO, C.S., WYSE, A.T.S., WAJNER, M. and WANNMACHER, C.M.D. Proline reduces creatine kinase activity in the brain cortex of rats. Neurochem. Res., 28 (8): 1175-1180, 2003 *in press*.
- KNOWLES, R.G. Nitric oxide biochemistry. Biochem. Soc. Trans., 25: 895-901, 1997.
- KRINSKY, N.I. Antioxidant functions of carotenoids. Free Rad. Biol. and Med., 7: 617-635, 1989.

- LEES, G.J. Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. Neuroscience, 54: 287-322, 1993.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L. and COX, M.M. Principles of Biochemistry, New York: Worth Publishers, Inc., 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.
- LIOCHEV, S.I. and FRIDOVICH, I. The role of  $O_2^{\bullet-}$  in the production of  $HO^{\bullet}$ : in vitro and in vivo. Free Radic. Biol. Med., 16: 29-33, 1994.
- LIPTON, S.A., CHOI, Y.B., PAN, Z.H., LEI, S.Z., CHEN, H.S., 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.
- LOO, Y.H., FULTON, A., MILLER, K. and WISNIEWSKI, M.H. Phenylacetate effects in synaptic development. Life Sci., 27: 1280-1289, 1980.
- MAIORINO, M., GREGOLIN, C. and URSINI, F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Meth. Enzymol., 186: 448-457, 1990.
- MARKS, D.B., MARKS, A.D. and SMITH, C.M. Amino Acids Found in Proteins. In: Basic Medical Biochemistry, Baltimore: Williams & Wilkins, 1996.
- MARKS, D.B., MARKS, A.D. and SMITH, C.M. Oxygen Metabolism and Oxygen Toxicity. In: Basic Medical Biochemistry, Baltimore: Williams & Wilkins, 1996.
- MARSHALL, W.J. and BANGERT, S.K. Free Radicals. In: Metabolic and Clinical Aspects., Clin. Biochem, 765-777, 1995.
- MARTIN, D., AULT, B. and NADLER, J.V. NMDA receptor-mediated depolarizing action of proline on CA1 pyramidal cells. Eur. J. Pharmacol., 219: 59-66, 1992.
- MILLS, G.C. Glutathione peroxidase and the destruction of hydrogen peroxide in animal tissues. Arch. Biochem. Biophys., 86: 1-5, 1960.
- MIXON, A.J., GRANGER, A.N. and PHANG, J.M. An assay for pyrroline-5-carboxylate based on its interaction with cysteine. Anal Lett, 24: 625, 1991.

- MOREIRA, J.C.F., WANNMACHER, C.M.D., COSTA, S.M. and WAJNER, M. Effect of proline administration on rat behavior in aversive and nonaversive tasks. Pharmac. Biochem. & Behav., 32: 885-890, 1989.
- NADLER, J.V. Sodium-dependent proline uptake in the rat hippocampal formation: association with ipsilateral-commissural projections of CA3 pyramidal cells. J. Neurochem., 49: 1155-1160, 1987.
- NADLER, J.V., WANG, A. and HAKIM, A. Toxicity of L-proline toward rat hippocampal neurons. Brain Res., 456: 168-172, 1988.
- NADLER, J.V., MARTIN, D., BRAY, S.D. and EVENSON, D.A. Proline as an excitatory amino acid in the hippocampal formation: Uptake autoradiography and receptor pharmacology. Soc. Neurosci. Abstr., 15: 644, 1989.
- NADLER, J.V., BRAY, S.D. and EVENSON, D.A. Autoradiographic localization of proline uptake in excitatory hippocampal pathways. Hippocampus, 2: 269-278, 1992.
- NADLER, J.V. and COHEN, S.M. Proline inhibits the release of glutamate and aspartate from Schaffer collateral-commissural terminal in rats. Soc. Neurosci. Abstr., 21: 353, 1995.
- NISTRÌ, A. and MORELLI, P. Effects of proline and other neutral amino acids on ventral root potentials of the frog spinal cord in vitro. Neuropharmacology, 17: 21-27, 1978.
- OLTON, D.S. and MARKOWSKA, A.L. Memory and hippocampal function as targets for neurotoxic substances. Neurotoxicology, 15: 439-443, 1994.
- PACE, J.R., MARTIN, B.M., PAUL, S.M. and ROWSKI, A. High concentration of neutral amino acids activate NMDA receptor currents in rat hippocampal neurons. Neurosci. Lett., 141: 97-100, 1992.
- PERES, W. Radicais livres em níveis biológicos, Pelotas, Educat, pp.1-85, 1994.
- PHANG, J.M. and SCRIVER, C.R. Disorders of proline and hydroxyproline metabolism. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. eds. The Metabolic Basis of Inherited Disease, New York: McGraw-Hill, 6 th ed., pp. 577-597, 1989.

- PHANG, J.M., YEH, G.C. and SCRIVER, C.R. Disorders of proline and hydroxyproline metabolism. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. eds. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, New York: McGraw-Hill, 7 th ed., pp.1125-1146, 1995.
- PHANG, J.M., HU, C.A. and VALLE, D. Disorders of proline and hydroxyproline metabolism. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. eds. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, New York: McGraw-Hill, 8 th ed., pp. 1821-1838, 2001.
- PONTES, Z.E., OLIVEIRA, L.S., BAVARESCO, C.S., STRECK, E.L., DUTRA-FILHO, C.S., WAJNER, M., WANNMACHER, C.M. and WYSE, A.T. Proline administration decreases  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in the synaptic plasma membrane from cerebral cortex of rats. Metab. Brain. Dis., 14: 265-272, 1999.
- PONTES, Z.L., OLIVEIRA, L.S., FRANZON, R., WAJNER, M., WANNMACHER, C.M.D. and WYSE, A.T.S. Inhibition of  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase activity from rat hippocampus by proline. Neurochem. Res., 26:1321-1326, 2001.
- RADI, R., BECKMAN, J.S., BUSH, K.M. and FREEMAN, B.A. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. J. Biol. Chem., 266: 4244-4250, 1991.
- REZNICK, A.Z. and PACKER, L. Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. In: Poli, G., Albano, E., Dianzani, M.U. (Eds.). Free Radicals: From Basic Science to Medicine, Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 425-437, 1993.
- RHOADS, D.E., PETERSON, N.A. and RAGHUPATHY, E. Selective inhibition of synaptosomal proline uptake by leucine and methionine enkephalins. J. Biol. Chem., 258: 12233-12237, 1983.
- RIOBO, N.A., SCHOPFER, F.J., BOVERIS, A.D., CADENAS, E. and PODEROSO, J.J. The reaction of nitric oxide with 6-hydroxydopamine: implications for Parkinson's disease. Free Radic. Biol. Med., 32: 115-121, 2002.
- ROBINSON, J. and BADWEY, J. The NADPH oxidase complex of phagocytic leukocytes: a biochemical and cytochemical view. Histochem., 103: 163-180, 1995.

- SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L., SLY, W.S. and VALLE, D. eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease, New York: McGraw –Hill, Inc., 8th ed., 2001.
- SHAFQAT, M.F. and FREMEAU, R.T. Human brain-specific L-proline transporter: molecular cloning, functional expression, and chromosomal localization of the gene in human and mouse genomes. Mol. Pharmacol., 48: 219-229, 1995.
- 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, 6 th ed., pp. 3-59,1983.
- STRECK, E.L, VIEIRA, P.S, WANNMACHER, C.M, DUTRA-FILHO, C.S, WAJNER, M. and WYSE, A.T. In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. Metab. Brain Dis., 18: 147-154, 2003.
- TRAVACIO, M. and LLESUY, S. Antioxidant enzymes and their modification under oxidative stress conditions. Free Rad. Res. Latin Amer., 48: 9-13, 1996.
- VAN HARREVELD, A. and FIFKOVÁ, E. Effects of amino acids on the isolated chicken retina, and on its response to glutamate stimulation. J. Neurochem, 20: 947-962, 1973.
- VELAZ-FAIRCLOTH, M., GUADANO-FERRAZ, A., HENZI, V.A. and FREMEAU, R.T. Mammalian brain-specific L-proline transporter. Neuronal localization of mRNA and enrichment of transporter protein in synaptic plasma membranes. J. Biol. Chem., 270: 15755-15761, 1995.
- VILASECA, M.D., PIREDÁ, M.A., CAMPISTOL, M., VERNET, J., PÓO, A., ARTUCH, R. and SIERRA, C. Tocopherol in inborn errors of intermediary metabolism. Clin. Chim. Acta, 263:147-155, 1997.
- VOET, D. and VOET, J.G. Amino acid metabolism. In: Biochemistry, John Wiley & Sons, Inc., New York, 3 ed., 1999.
- VOET, D., VOET, J.G. and PRATT, C.W. Aminoácidos. In: Fundamentos de Bioquímica, Artes Médicas Sul, Porto Alegre, 3 ed., 2000.

- WANNMACHER, C.M.D., WAJNER, M., GIUGLIANI, R., GIUGLIANI, E.R.J., COSTA, M.G. and GIUGLIANI, M.C.K. Detection of metabolic disorders among high risk patients. Rev. Bras. Genet., 5: 187-194, 1982.
- WEBSTER, N.R. and NUNN, J.F. Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. Br. J. Anaesth., 60: 98-108, 1988.
- WEISS, S.J. Oxygen, ischemia and inflammation. Acta Physiol Scand, 548: 9-37, 1986.
- WENDEL, A. Glutathione peroxidase. Met. Enzymol., 77: 325-332, 1981.
- WILSON, R.L. Hydroxyl radicals and biological damage in vitro: what relevance in vivo? IN: Oxygen free radicals and tissue damages. Ciba Foundation Symposium 65, Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 19-42, 1979.
- WYSE, A.T.S., BOLOGNESI, G., BRUSQUE, A.M., WAJNER, M. and WANNMACHER, C.M.D. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats subjected to chemically induced phenylketonuria. Med. Sci. Res., 23: 261-263, 1995.
- WYSE, A.T., BRUSQUE, A.M., SILVA, C.G., STRECK, E.L., WAJNER, M. and WANNMACHER, C.M. Inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase from rat brain cortex by propionic acid. Neuroreport, 9: 1719-1721, 1998.
- WYSE, A.T.S., STRECK, E.L., WORM, P., WAJNER, A., RITTER, F. and NETTO, C.A. Preconditioning prevents the inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity after brain ischemia. Neurochem. Res., 25: 971-975, 2000.
- WYSE, A.T.S., BAVARESCO, C.S., HAGEN, M.E.K., DELWING, D., DUTRA-FILHO, C.S. and WAJNER, M. In vitro stimulation of oxidative stress in cerebral cortex of rats by the guanidino compounds accumulating in hyperargininemia. Brain Res., 923: 50-57, 2001.