

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Bioquímica

**EFEITO *IN VITRO* DO GUANIDINO ACETATO SOBRE AS ATIVIDADES DA
 Na^+, K^+ -ATPASE E DA ACETILCOLINESTERASE EM CÉREBRO DE RATOS
JOVENS.**

Alexandra Ioppi Zugno

Orientadora: Prof^a Dr^a Angela Terezinha de Souza Wyse

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 título de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, 2004

A meus pais Alexandre e Ana Lucia, por serem meus
maiores exemplos na vida.

À minha irmã Paula, pela companhia e amizade
durante todos esses anos.

Ao meu namorado Emilio, por ter me levado à Bioquímica,
pelo apoio, amor e por nunca deixar de ser o meu melhor amigo.

A Vida por Inteiro

Para desvendar a vida,
não bastam as ciências,
são necessárias também as artes.
e para viver a vida verdadeira,
a vida por inteiro,
é preciso a ela entregar-se
com amor e paixão.

Clovis Wannmacher

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Angela, pela dedicação, conhecimentos e ajuda durante a orientação deste trabalho.

Ao meu querido “avô” Clovis, pelo carinho, companhia no laboratório e pelas balinhas.

Aos professores Moacir e Dutra, pela amizade, carinho e conhecimento.

Aos que me ajudaram neste trabalho incansavelmente, Thiaguinho, Renata, Fábria, Fran e Xuxa.

Aos meus “ombros amigos” (porque temos 2 ombros), Fran e Carol, por estarem sempre comigo durante esse tempo até nos momentos mais chatos e de maior dúvida.

Aos colegas e amigos do laboratório “34A”, Dani, Débora, Renata, Fran, Siomara, Caren, Cris, Fábria, Thiaguinho, Marcelo, Carol e Lorenzo; colegas do laboratório “34C”, Virginia, Luciane, Andréa e Rochele; colegas do laboratório 36, Carol, Ângela, Carla, Karina e colegas do laboratório 38, Rafa, Guilhian, Karina, Pati, César, Vânia, Denis e Letícia, por deixarem os trabalhos nos laboratórios muito mais divertidos.

Às minhas amigas, Jô, Bibi, Lurdinha.

À minha eterna e fiel torcida, meus primos e tios, em especial, pai e mãe, meu dindo Moacir, minha dinda Regina, tia Vera e meus primos Cris e Dani.

À toda a família do Xuxa, pela atenção e carinho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

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

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

A Deus.

RESUMO

A deficiência de guanidino acetato metiltransferase (GAMT) é um erro inato do metabolismo da creatina caracterizado por hipotonia muscular, movimentos extrapiramidais involuntários e epilepsia. A doença é bioquimicamente caracterizada por acúmulo de guanidino acetato e deficiência de creatina e fosfocreatina nos tecidos dos pacientes afetados. Os mecanismos de disfunção neurológica que ocorrem nessa doença ainda são desconhecidos.

A Na^+, K^+ -ATPase desempenha um papel fundamental no sistema nervoso central (SNC), sendo responsável pela manutenção dos gradientes iônicos e pela propagação do impulso nervoso, consumindo cerca de 50% do ATP formado no cérebro.

A acetilcolinesterase (AChE) é uma importante enzima regulatória que controla a transmissão de impulsos nervosos através de sinapses colinérgicas pela hidrólise da acetilcolina, e apresenta um papel fundamental na cognição.

Com o propósito de ampliar o conhecimento sobre os mecanismos fisiopatológicos da deficiência de GAMT, esse trabalho teve como objetivo investigar o efeito do guanidino acetato, o principal metabólito acumulado na deficiência de GAMT, sobre as atividades das enzimas Na^+, K^+ -ATPase, Mg^{2+} -ATPase e AChE em estriado de ratos. A cinética de inibição da Na^+, K^+ -ATPase causada pelo guanidino acetato também foi estudada. Além disso, investigamos o efeito *in vitro* do guanidino acetato sobre as atividades da Na^+, K^+ -ATPase, Mg^{2+} -ATPase e da AChE de hipocampo de ratos.

Nossos resultados mostraram que o guanidino acetato não altera as atividades da AChE e Mg^{2+} -ATPase. No entanto, a atividade da Na^+, K^+ -ATPase foi inibida por esse composto guanidínico (CG), e a análise cinética mostrou uma inibição do tipo incompetitiva. Também foi demonstrada uma interação entre o guanidino acetato e o ácido arginínico, sugerindo um sítio comum de ligação entre esses dois compostos na Na^+, K^+ -ATPase.

Os resultados mostraram que, o guanidino acetato inibiu a atividade da Na^+, K^+ -ATPase *in vitro* mas não alterou as atividades da Mg^{2+} -ATPase e da AChE.

Considerando que o guanidino acetato e outros compostos guanidínicos (CG) induzem a formação de espécies reativas de oxigênio e que a Na^+, K^+ -ATPase e a AChE são inibidas por radicais livres, estudamos o efeito da pré-incubação de homogeneizado de hipocampo de ratos na presença de guanidino acetato sobre a atividade dessas enzimas. Além disso, o efeito da pré-incubação de homogeneizado de ratos com guanidino acetato foi investigado na presença e ausência de antioxidantes, tais como glutathione (GSH), trolox, taurina e L-NAME .

A pré-incubação de homogeneizado de hipocampus na presença de guanidino acetato inibiu a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, mas não alterou a atividade da Mg^{2+} -ATPase. No entanto, L-NAME e taurina foram capazes de prevenir tal efeito.

Dessa forma, propõem-se que a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase pelo guanidino acetato seja um dos mecanismos envolvidos na disfunção neuronal observada em pacientes com deficiência de GAMT.

ABSTRACT

Guanidinoacetate methyltransferase deficiency (GAMT-deficiency) is an inborn error of creatine metabolism characterized by muscular hypotonia, involuntary extrapyramidal movements and epilepsy. The disease is biochemically characterized by accumulation of guanidinoacetate and deficiency of creatine and phosphocreatine in tissues of affected patients. However, the mechanisms underlying the neurological dysfunction of GAMT-deficiency patients are not well understood.

Na^+, K^+ -ATPase plays a fundamental role in central nervous system and is responsible for the maintenance of ionic gradient necessary for neuronal excitability, consuming about 50% of the ATP generated in this tissue.

Acetylcholinesterase (AChE) is an important regulatory enzyme that controls the transmission of nerve impulses across cholinergic synapses by hydrolyzing the excitatory transmitter acetylcholine, playing a crucial role in cognitive functions.

In order to better understand the physiopathological mechanisms of GAMT-deficiency, in this work our objective was to investigate the *in vitro* effect of guanidinoacetate on Na^+, K^+ -ATPase, Mg^{2+} -ATPase and AChE activities in rat striatum. Besides, we studied the kinetics of inhibition of Na^+, K^+ -ATPase activity caused by guanidinoacetate. We also investigated the *in vitro* effect of guanidinoacetate on Na^+, K^+ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase activities in synaptic plasma membranes and AChE activity in homogenates from hippocampus of young rats.

Our results showed that guanidinoacetate did not alter Mg^{2+} -ATPase and AChE activities. However, Na^+, K^+ -ATPase activity was inhibited by guanidinoacetate, and the inhibition was of the uncompetitive type. Our results also showed a interaction between guanidinoacetate and argininic acid, suggesting a common binding site for guanidino compounds on Na^+, K^+ -ATPase.

Results showed that GAA inhibited Na^+, K^+ -ATPase activity, but did not alter Mg^{2+} -ATPase and AChE activities

Considering that guanidinoacetate and others guanidino compounds induce free radicals formation and that Na^+, K^+ -ATPase and AChE are inhibited by free radicals, we investigated the effect of rat hippocampus homogenates incubation in the presence of guanidinoacetate on the enzymes activities. Besides, we evaluated the effect of glutathione (GSH), trolox, L-NAME and taurine (Tau) on incubation of hippocampus homogenates in the presence and absence of guanidinoacetate on Na^+, K^+ -ATPase activity.

Our results showed that incubation of hippocampus homogenates with guanidinoacetate inhibits Na^+, K^+ -ATPase activity, but does not alter Mg^{2+} -ATPase activity. Besides, L-NAME and Tau prevented the inhibitory effect of guanidinoacetate on this enzyme activity.

Our findings indicate that inhibition of Na^+, K^+ -ATPase activity by guanidinoacetate may contribute to the neurological dysfunction characteristic of GAMT-deficiency patients.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – acetilcolina

AChE – acetilcolinesterase

AGAT – arginina - glicina amidino transferase

ATP – adenosina trifosfato

CG – compostos guanidínicos

EIM – erros inatos do metabolismo

GABA – ácido γ -aminobutírico

GAMT – guanidino acetato metiltransferase

GSH – glutathiona reduzida

L-NAME - N^o-nitro-L-arginina metil ester

NMDA – N-metil-D-aspartato

SNC – sistema nervoso central

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo do guanidino acetato e deficiência da enzima guanidino acetato metiltransferase	15
Figura 2. Estrutura da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	21
Figura 3. Mecanismo de ação da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	22
Figura 4. Estrutura da acetilcolinesterase	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações de guanidino acetato no plasma e na urina de indivíduos normais e afetados pela deficiência de GAMT	17
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Erros Inatos do Metabolismo	10
1.2. Compostos guanidínicos e guanidino acetato	11
1.3. Deficiência de guanidino acetato metiltransferase (GAMT)	13
1.3.1. Histórico e conceito	13
1.3.2. Fisiopatologia.....	15
1.3.3. Diagnóstico	17
1.3.4. Tratamento	18
1.4. Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	19
1.5. Acetilcolinesterase	24
2. OBJETIVOS	28
3. RESULTADOS	29
3.1. Inhibition of Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase activity in rat striatum by guanidinoacetate. Publicado na revista International Journal of Developmental Neuroscience. 2003 Jun; 21(4):183-189	29
3.2. Taurine and L-NAME prevent the inhibition of hippocampal Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase activity caused by guanidinoacetate. Submetido para a revista Neurochemical Research	30
4. DISCUSSÃO	31
5. CONCLUSÕES	40
6. PERSPECTIVAS	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

1.1. ERROS INATOS DO METABOLISMO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são doenças causadas por genes mutantes que geralmente resultam em proteínas anormais, mais freqüentemente enzimas. Os defeitos hereditários podem se expressar como uma perda total ou parcial da atividade enzimática. Sem tratamento, esses defeitos hereditários quase sempre resultam em retardo mental ou outras anormalidades do desenvolvimento, devido ao acúmulo prejudicial de metabólitos ou falta de produtos essenciais.

O termo “erros inatos do metabolismo” foi sugerido por Sir Archibald Garrod no início do século XX, e hoje é usado para designar cerca de 500 doenças descritas em Scriver e colaboradores (2001), a maioria delas envolvendo processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (BENSON e FENSON, 1985).

Embora individualmente raros, os EIM são relativamente freqüentes em seu conjunto, estimando-se que possa ocorrer até 1 caso em cada 1.000 recém-nascidos vivos (GIUGLIANI, 1988).

As manifestações clínicas dos EIM são extremamente diversas, enquanto alguns são absolutamente assintomáticos, outros são tão graves que resultam em morte neonatal. No entanto, algumas manifestações clínicas ocorrem com mais freqüência nos EIM, tais como deficiências no desenvolvimento, vômitos, diarréia, letargia, coma, convulsões, hipotonia,

apnéia, hepatomegalia, odor anormal da urina ou na pele, atraso no desenvolvimento psicomotor e neurodegeneração (SCRIVER et al., 2001).

O diagnóstico deve ser rápido, já que uma série de erros inatos manifestam-se no período pré-natal. Atualmente são realizados exames de triagem ("triagem neonatal para EIM", ou o Teste do Pezinho) nos primeiros dias de vida da criança.

O tratamento é tanto mais bem sucedido quanto mais precoce é o diagnóstico e normalmente é feito utilizando estratégias terapêuticas isoladas ou combinadas, da seguinte forma: limitando a entrada do precursor, suplementando o metabólito ausente ou a enzima deficiente, inibindo a formação da substância acumulada ou controlando fatores desencadeantes.

Dentre os EIM conhecidos, os mais freqüentes são os de aminoácidos e de ácidos orgânicos. Destaca-se em nosso estudo a deficiência de guanidino acetato metiltransferase (GAMT), um EIM dos ácidos orgânicos.

1.2. COMPOSTOS GUANIDÍNICOS E GUANIDINO ACETATO

Os compostos guanidínicos (CG) são substâncias que apresentam um grupo guanidino em sua estrutura, $\text{H}_2\text{N} - \text{C}(=\text{NH}) - \text{NH} -$, exercem um importante papel biológico, incluindo a participação da arginina na síntese de uréia (KREBS e HENSELEIT, 1932) e da creatina na contração muscular (EGGLETON e EGGLETON, 1927). Até o momento foram descritos aproximadamente 120 CG, e destes, 27 já foram isolados em animais ureotélicos, sendo que a maioria desses compostos é catabólito direto ou

indireto da arginina (MARESCAU et al., 1992). Os principais CG descritos e encontrados em animais são creatina, creatinina, homoarginina, metilguanidina, ácido β - guanidino propiônico, ácido γ - guanidino butírico, ácido arginínico, ácido guanidino etanossulfônico e ácido guanidino acético (MARESCAU et al., 1992).

O ácido guanidino acético ou guanidino acetato, é um CG sintetizado a partir de arginina e glicina, pela enzima arginina - glicina amidino transferase (AGAT). Essa enzima catalisa a primeira de duas reações que transferem o grupo amidino para a glicina, para formar guanidino acetato (VON FIGURA et al. 2001).

A guanidino acetato metiltransferase (GAMT) catalisa o segundo passo da biossíntese de creatina, transformando o guanidino acetato em creatina, (Figura 1) principalmente no fígado e pâncreas. Apesar dos níveis consideráveis de guanidino acetato e creatina nesses órgãos, esses contêm poucos níveis de creatina quinase, o que indica que essas substâncias são transportadas para tecidos com alta demanda de energia e que apresentam níveis de creatina quinase significativos, tais como músculo esquelético, coração e cérebro (SCHULZE et al., 1997). O transportador de creatina pertence à família dos transportadores sódio-dependentes de GABA, dopamina, serotonina, glicina, prolina, catecolaminas e taurina (GUIMBAL e KILIMANN, 1993). A expressão do transportador é regulada pela creatina. O guanidino acetato está presente no plasma de indivíduos normais em valores que podem variar entre 0,8 e 5,0 μM (DE DEYN et al., 1986), enquanto que a concentração de creatina varia de 10 a 100 μM (MARESCAU et al., 1986).

As baixas concentrações de creatina e fosfocreatina e o acúmulo de guanidino acetato no cérebro, associados aos sintomas característicos, sugerem uma alteração na biossíntese de creatina, principalmente na deficiência da GAMT (VON FIGURA et al., 2001).

1.3. DEFICIÊNCIA DE GUANIDINO ACETATO METILTRANSFERASE (DEFICIÊNCIA DE GAMT) [E.C. 2.1.1.2]

1.3.1. HISTÓRICO E CONCEITO

A creatina foi descrita pela primeira vez por Chevreul em 1835 e von Liebig em 1847, porém a sua síntese e metabolismo só foram elucidados em um período de mais de 100 anos. Sabe-se hoje da extrema importância desse metabólito no organismo, tendo como principais funções a formação de fosfocreatina no músculo e cérebro. Essa substância atua como reservatório de fosfatos, os quais podem ser doados para formar ATP (STRYER, 1996). As concentrações de creatina e creatinina no plasma e na urina têm sido usadas como marcadores de doenças, principalmente renais (STÖCKLER et al., 1994). A descoberta do primeiro EIM da síntese da creatina (a deficiência de GAMT) ocorreu em 1994 após observações de níveis extremamente baixos desse metabólito na urina dos pacientes (STÖCKLER et al., 1994).

O primeiro caso relatado de deficiência de GAMT foi de uma paciente que nasceu após uma gestação normal, com tamanho, peso e desenvolvimento neonatal normais. Nas 5 semanas seguintes, o paciente

começou a apresentar hipotonia e, com o passar das semanas, o quadro evoluiu para um atraso de desenvolvimento global, incluindo retardo mental, movimentos irregulares dos olhos, hipotonia e fraqueza muscular (STÖCKLER et al., 1994). As investigações bioquímicas revelaram hipoamonemia, hiperornitinemia e excreção urinária de ácidos orgânicos, como o metilglutarônico e metilmalônico. Investigações por ressonância magnética no cérebro desse paciente mostraram ausência de pico de creatina e um elevado pico de guanidino acetato. A combinação de altos níveis de guanidino acetato e deficiência de creatina sugeriram um bloqueio na síntese de creatina e na enzima que converte guanidino acetato em creatina (VON FIGURA et al., 2001)

Dessa forma, a doença foi descoberta como sendo um EIM de ácidos orgânicos, causada pela deficiência da enzima guanidino acetato metiltransferase (GAMT). O bloqueio desta rota metabólica provoca acúmulo de guanidino acetato e diminuição nas concentrações de creatina e fosfocreatina. Como a doença foi descrita recentemente, sua freqüência ainda não é conhecida. A herança é do tipo autossômica recessiva (VON FIGURA et al., 2001).

A alteração da GAMT ocorre devido a um defeito molecular presente em dois alelos deficientes codificadores da GAMT. Inicialmente foram encontrados substituições em bases no nucleotídeo 327 (substituindo G por A) e, em outro caso, uma inserção de 13 pares de bases na posição 309 (STÖCKLER et al., 1994).

Mutações patológicas foram descritas em duas crianças com sinais e sintomas sugestivos da doença. A região telomérica do cromossomo 19 humano foi identificada como sendo a região carreadora do gene da GAMT.

Este gene codificador foi identificado como 19p13.3, com aproximadamente 5 Kb e 6 exons (JENNE et al., 1997; CHAE et al., 1998).

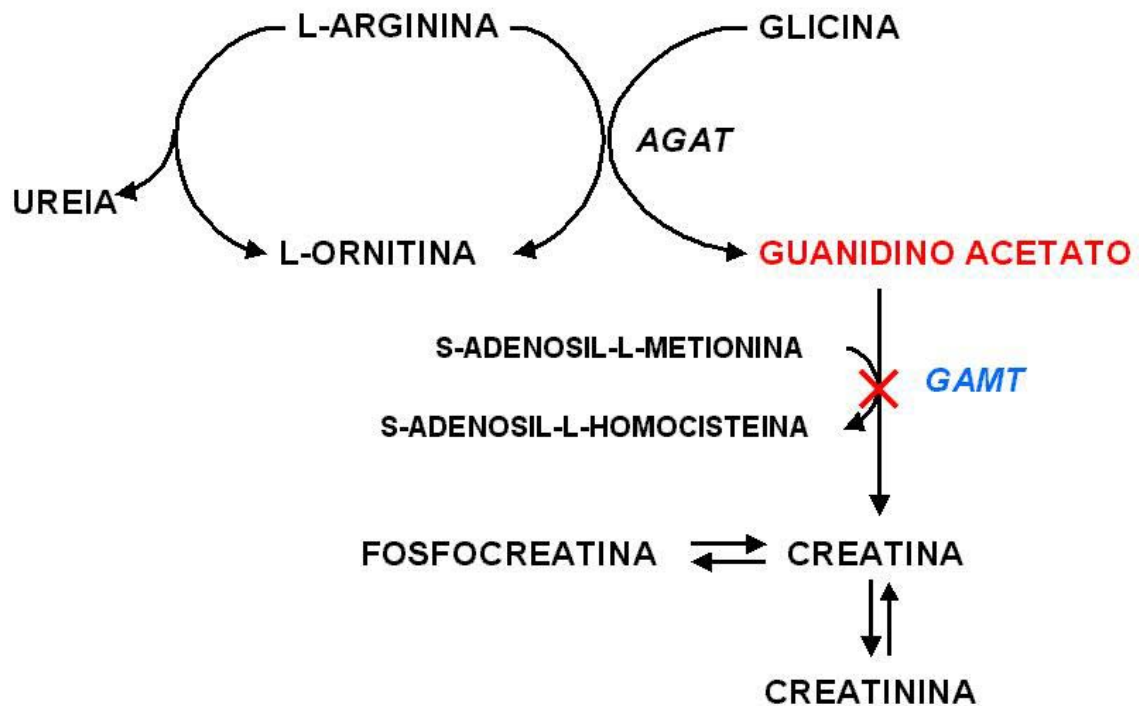


FIGURA 1. Metabolismo do guanidino acetato e deficiência da enzima guanidino acetato metiltransferase.

(adaptado de Zugno et al., 2003)

AGAT – arginina-glicina amidino transferase;

GAMT – guanidino acetato metiltransferase

1.3.2. FISIOPATOLOGIA

O papel do guanidino acetato sobre as alterações do sistema nervoso central é incerto e não se sabe ainda quais as verdadeiras causas da doença. No entanto, as manifestações neurológicas encontradas nos pacientes associadas ao acúmulo dessa substância no cérebro, sugerem uma ação

neurotóxica (SCHULZE et al., 2001). Além disso, a creatina também parece ter importância significativa, principalmente nos sintomas musculares (SCHULZE et al., 1997). Muitos estudos estão sendo feitos na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos na disfunção cerebral da deficiência de GAMT.

O potencial neurotóxico de muitos CG foi estudado e sugere-se uma possível interação dos mesmos com receptores GABA_A (DE DEYN et al., 1991; D'HOOGE et al., 1999). Mais recentemente, Neu e colaboradores (2002) mostraram que o guanidino acetato também atua nesses receptores como agonista, sugerindo um possível mecanismo de indução de disfunção neuronal em pacientes com deficiência de GAMT. A estimulação prolongada desses receptores pode causar uma desestabilização dos mesmos e aumentar a excitabilidade neuronal (NEU et al., 2002). Além disso, propriedades epileptogênicas do guanidino acetato foram recentemente demonstradas por Schulze e colaboradores (2001).

Acredita-se também que o estresse oxidativo possa estar envolvido na fisiopatologia desta doença. Mori e colaboradores (1996) mostraram que alguns CG, entre eles o guanidino acetato, foram capazes de gerar o radical OH[•] em solução aquosa. Além disso, o óxido nítrico parece ser produzido por muitos CG, já que o guanidino succinato parece agir como um precursor da síntese de óxido nítrico, além da própria arginina, que é o substrato da enzima óxido nítrico sintase (RICHARD et al., 1994). O excesso na produção de óxido nítrico pode ser prejudicial, pois esse composto conjuga-se com o ânion superóxido e forma peroxinitrito, um poderoso agente oxidante (BECKMAN et al., 1990). Nesse contexto, vem sendo proposto que o guanidino acetato pode

estar envolvido na neuropatologia da deficiência de GAMT (VON FIGURA et al., 2001).

1.3.3. DIAGNÓSTICO

Os achados laboratoriais e as manifestações clínicas da deficiência de GAMT são heterogêneas. Os valores das concentrações plasmática, urinária e líquóricas de guanidino acetato em pacientes normais e portadores da deficiência estão demonstrados na tabela 1 (VON FIGURA et al., 2001).

Tabela 1 – Concentrações de guanidino acetato no plasma e na urina de indivíduos normais e afetados pela deficiência de GAMT (STÖCKLER et al., 1997; LEUZZI et al., 2000; VON FIGURA et al. 2001; NEU et al., 2002).

	Plasma (μM)	Urina (μM)	Líquor (μM)
Indivíduos Normais	0,83 – 1,1	65 – 430	0,05 – 0,08
Deficiência de GAMT	10 – 30	2.220 – 4.000	10,6 – 12,7

As principais manifestações clínicas são atraso no desenvolvimento, hipotonia, dicinesia, retardo mental, movimentos involuntários extrapiramidais e epilepsia (SCHULZE et al., 1997; VON FIGURA et al., 2001).

O diagnóstico é feito durante os primeiros meses de vida, de acordo com a suspeita clínica, observando-se os sinais e sintomas característicos da

doença. Anormalidades identificadas pela ressonância magnética no globo pálido parecem ser uma característica importante (VON FIGURA et al., 2001).

1.3.4. TRATAMENTO

A depleção de creatina também parece ser de extrema importância na fisiopatologia da deficiência de GAMT. Essa substância é fundamental para o cérebro, sendo que sua concentração é de 2 a 3 vezes maior que a concentração de ATP (VON FIGURA et al., 2001). Na deficiência de GAMT, a baixa concentração de creatina parece estar intimamente ligada a sintomas como fraqueza muscular e hipotonia, já que a suplementação de creatina como adjunto no tratamento, ameniza essas alterações porém, o mesmo não ocorre na disfunção neurológica encontrada (STÖCKLER et al., 1996).

Os níveis de creatina e creatinina em pacientes com a deficiência de GAMT estão muito abaixo dos níveis normais encontrados no sangue e na urina de indivíduos normais. A detecção de níveis elevados de guanidino acetato na urina é uma alteração bioquímica específica da deficiência de GAMT (SCHULZE et al., 1997). Os métodos de determinação desses compostos são cromatografia, colorimetria e ressonância magnética (WEVERS et al., 1995; SCHULZE et al., 1996; HUNNEMAN e HANEFEL, 1997; SHIROKANE et al., 1991). A confirmação do diagnóstico é realizada pela determinação da atividade da GAMT e pelo rastreamento genético (VON FIGURA et al., 2001).

A suplementação alimentar de creatina tem sido utilizada e corrige parcialmente a deficiência desse composto no cérebro, além de normalizar a

excreção urinária de creatinina. No entanto, os níveis plasmáticos de guanidino acetato permanecem altos, sugerindo que a suplementação com creatina não é suficiente para diminuir o acúmulo desse ácido orgânico (VON FIGURA et al., 2001).

O acúmulo de guanidino acetato parece estar relacionado com os sintomas neurológicos da deficiência de GAMT, tais como convulsão e epilepsia. Dessa forma, Schulze e colaboradores (2001) desenvolveram um novo tratamento, na tentativa de reduzir os níveis de guanidino acetato nos fluidos dos pacientes através da restrição de arginina e de ornitina na dieta. Essa terapia obteve sucesso, pois reduziu significativamente os níveis de guanidino acetato no plasma e na urina, além de diminuir a epilepsia. Isso sugere que o guanidino acetato é um agente epileptogênico em humanos mostrando a gravidade desse acúmulo no SNC.

1.4. Na^+, K^+ -ATPase [EC 3.6.1.37]

Na década de 30, achava-se que a membrana celular era impermeável ao sódio. No entanto, Hevesy, em 1938, utilizando isótopos radioativos de sódio e potássio, demonstrou a permeabilidade da membrana a esses íons (SKOU e ESMANN, 1992). A idéia da existência de uma bomba de sódio-potássio na membrana surgiu em 1941, por Dean, através de experimentos realizados por Heppel e Schmidt (1938), Heppel (1939), e Steinbach (1940) (citados por SKOU e ESMANN, 1992).

Em 1957, Skou sugeriu uma proteína de membrana com propriedades catalíticas (uma ATPase) capaz de realizar o transporte ativo de sódio e potássio contra seus gradientes de concentração, utilizando o ATP como fonte de energia (SKOU, 1957). Com essa descoberta, Jean C. Skou, em 1997, recebeu o Prêmio Nobel de Química.

A Na^+, K^+ -ATPase, também conhecida como bomba de sódio-potássio, é uma enzima que catalisa o transporte ativo de sódio e potássio através da membrana celular. Esse transporte é de grande importância já que mais de um terço do ATP consumido é utilizado para bombear tais íons (STRYER, 1996).

A Na^+, K^+ -ATPase mantém níveis intracelulares elevados de potássio e baixos de sódio, através da translocação desses íons contra seus gradientes de concentração. A enzima transporta três íons sódio para fora e dois íons potássio pra dentro da célula, utilizando um ATP como força-motriz (BLANCO e MERCER, 1998). A Na^+, K^+ -ATPase está presente em praticamente todas as células, incluindo o cérebro e os músculos esquelético e cardíaco.

A Na^+, K^+ -ATPase é constituída de duas subunidades, α e β , que formam um tetrâmero. A subunidade α é formada de aproximadamente 1012 aminoácidos, com massa aproximada de 112 kDa (SKOU e ESMANN, 1992). Já foram descritas quatro isoformas da subunidade α , α_1 , α_2 , α_3 e α_4 , que atuam em diferentes tecidos, sendo a α_3 encontrada no cérebro (BLANCO e MERCER, 1998; BLANCO et al., 2000). Nessa subunidade encontram-se os sítios de ligação de ATP, íons e ouabaína, e ela é responsável pelas propriedades catalíticas e de transporte da enzima (BLANCO e MERCER, 1998).

A subunidade β é constituída de aproximadamente 300 aminoácidos com massa molecular de 55 kDa. Já foram descritas quatro isoformas, β_1 , β_2 , β_3 e β_4 (SKOU e ESMANN, 1992; KAPLAN, 2002). Essa subunidade parece estar intimamente ligada a estrutura, já que a subunidade α perde sua atividade ao ser separada da subunidade β . Além disso, ela está ligada à afinidade dos íons pela enzima (SKOU e ESMANN, 1992; BLANCO e MERCER, 1998).

Além dessas subunidades, foi descrita uma terceira: a subunidade γ . É uma proteína pequena com cerca de 12 kDa de massa molecular, que ainda não tem sua função esclarecida (BLANCO e MERCER, 1998). Embora essa subunidade não seja essencial para a função da enzima, ela modula a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, principalmente no rim (THERIEN et al., 1997).

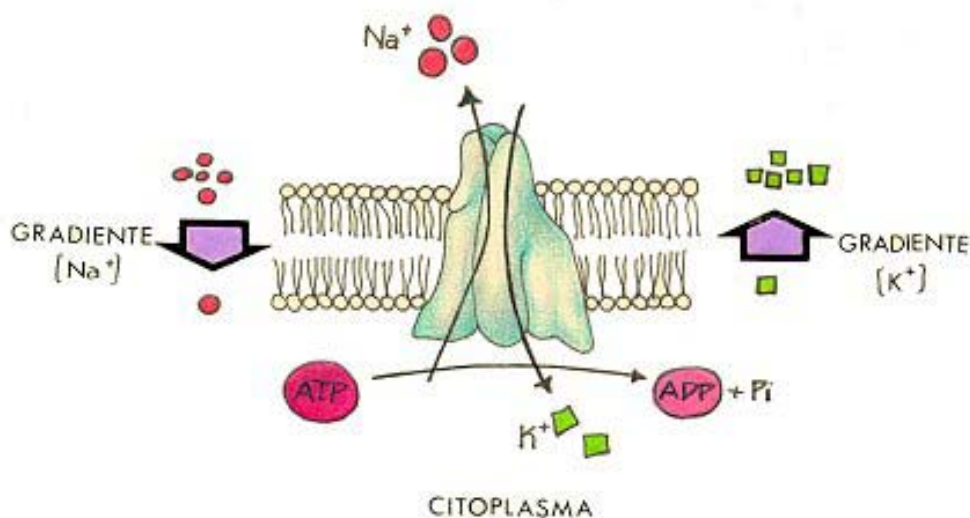


Figura 2. Estrutura da Na^+, K^+ -ATPase. (Solomon et al., 1993)

O mecanismo de reação da Na^+, K^+ -ATPase se dá inicialmente pela ligação de três íons sódio na porção intracelular da enzima, quando ocorre uma mudança conformacional da enzima que é fosforilada. Os sítios de ligação de

sódio ficam expostos ao meio extracelular e são liberados (GLYNN, 1993). Após o bombeamento dos três íons sódio para fora da célula, dois íons potássio ligam-se em sítios específicos da enzima e o fosfato é liberado mudando novamente a conformação e liberando o potássio ligado para o meio intracelular. A Na^+, K^+ -ATPase apresenta duas formas conformacionais: uma desfosforilada, com alta afinidade pelo sódio e baixa pelo potássio e outra fosforilada, com alta afinidade pelo potássio e baixa por sódio (GLYNN, 1993; LINGREL e KUNTZWEILER, 1994; KAPLAN, 2002).

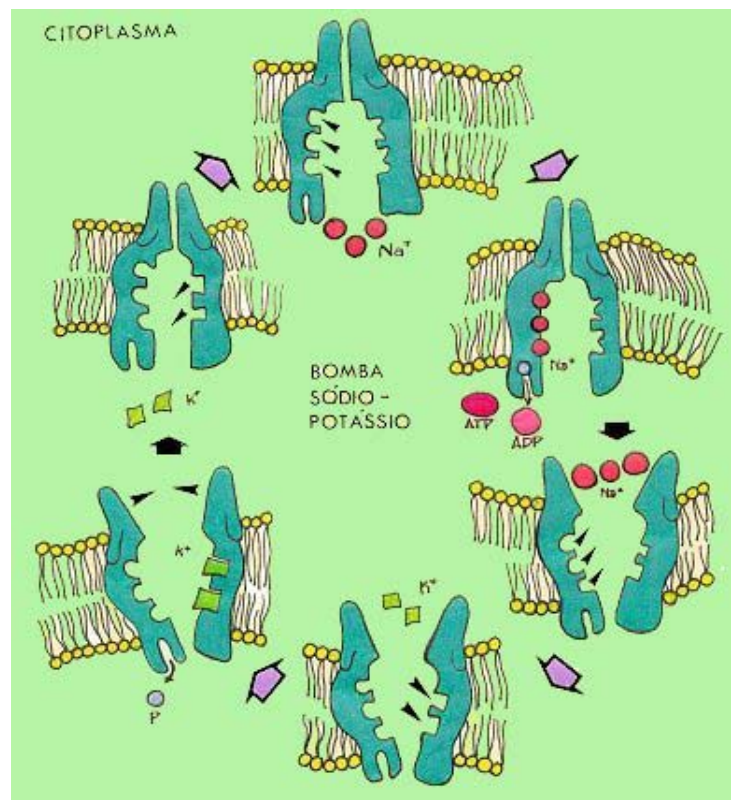


Figura 3. Mecanismo de ação da Na^+, K^+ -ATPase. (Solomon et al., 1993)

As funções neuronais, responsáveis por geração, transmissão e propagação do impulso nervoso dependem da atividade do neurônio e esta

está intimamente ligada aos íons e seus potenciais de ação através da membrana (ERECINSKA e DAGANI, 1990). Dessa forma, a Na^+, K^+ -ATPase desempenha um papel fundamental no sistema nervoso central (SNC), sendo responsável pela manutenção dos gradientes iônicos e pela propagação do impulso nervoso (GLYNN, 1993), consumindo cerca de 50% do ATP formado no cérebro (LEES, 1991).

Considerando a importância da enzima para o funcionamento normal do organismo e do SNC, e seu papel fundamental na manutenção do gradiente elétrico da membrana celular, a inibição da Na^+, K^+ -ATPase tem sido associada a diversas neuropatologias, como a isquemia cerebral (WYSE et al., 2000b), epilepsia (GRISAR, 1984), crises convulsivas (RENKAWEK et al., 1992) e doença de Alzheimer (HATTORI et al., 1998).

Estudos têm mostrado que inibidores da Na^+, K^+ -ATPase, como a ouabaína, podem provocar morte neuronal em hipocampo de ratos (LEES et al., 1990). Além disso, estudos realizados em nosso laboratório mostram que metabólitos acumulados em alguns EIM inibem a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em cérebro de ratos. Alguns aminoácidos, tais como fenilalanina (WYSE et al., 1995; WYSE et al., 1999), prolina (PONTES et al., 1999), arginina, (REIS et al., 2002) e homocisteína (STRECK et al., 2002a; STRECK et al., 2002b) inibiram a atividade dessa enzima em cérebro de ratos *in vitro* e *in vivo*. Além desses aminoácidos, algumas substâncias como o ácido metilmalônico, ácido propiônico (WYSE et al., 1998a, WYSE et al., 2000a) e alguns CG, os quais estão acumulados na hiperargininemia, também inibem a atividade da Na^+, K^+ -ATPase (SILVA et al., 1999).

A Na^+, K^+ -ATPase é inibida pela ação de radicais livres (LEES, 1993). Sato e colaboradores (1995) mostraram essa enzima é inibida pelo óxido nítrico em cérebro de porcos. Além disso, dados da literatura demonstram que a inibição da Na^+, K^+ -ATPase induzida por radicais livres é prevenida pela adição de antioxidantes tais como L-cisteína, glutatona e α -tocoferol (KURELLA et al., 1999; TSAKIRIS et al., 2000).

1.5. ACETILCOLINESTERASE [E.C. 3.1.1.7]

A acetilcolina (ACh) foi inicialmente descrita por Hunt em 1907, como um mediador da função celular e em 1914, Dale mostrou que a ACh estimulava o nervo parassimpático. A partir deste ponto, foi descrito, purificado e determinado o receptor nicotínico, sendo que hoje já foram descritos muitos subtipos desse receptor, além da estrutura das colinesterases e transportadores (citado por TAYLOR e BROWN, 1994). Sabe-se também que além da ação neurotransmissora, a ACh possui também uma função moduladora, pois regula a ação de outros neurotransmissores no SNC (TAYLOR e BROWN, 1994).

A ACh é um neurotransmissor excitatório que atua na junção neuromuscular de neurônios pós-sinápticos e músculos esqueléticos (NELSON e COX, 2000). Esse neurotransmissor ativa rapidamente o seu receptor, que se abre em resposta a um aumento repentino da ACh na fenda. Ela é armazenada em vesículas no neurônio pré-sináptico e, com a despolarização, a vesícula migra e libera a ACh para a fenda sináptica, onde liga-se a receptores

muscarínicos localizados na membrana pré e pós-sináptica (SOREQ e SEIDMAN, 2001). Além disso, na fenda ainda situa-se a acetilcolinesterase, enzima que hidrolisa a ACh em colina e acetato, permitindo a transmissão de potenciais de ação de alta frequência nas sinapses (STRYER, 1996).

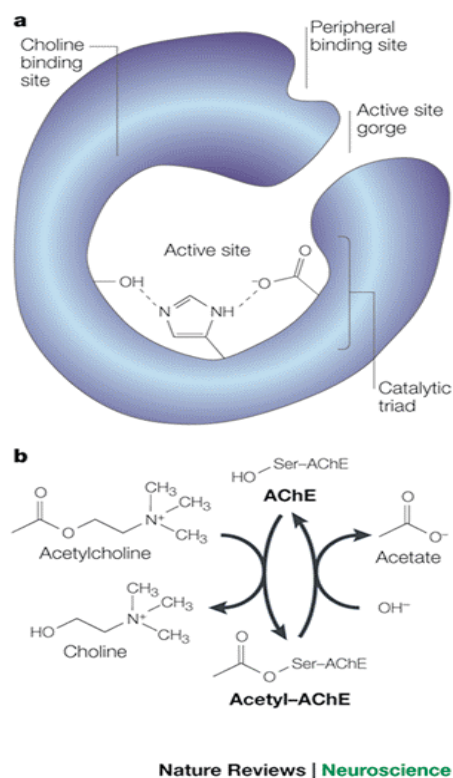


Figura 4. Estrutura da acetilcolinesterase. (Adaptado de Soreq e Seidman, 2001)

A AChE, enzima mais importante das colinesterases, é uma serina hidrolase que catalisa a hidrólise da ACh inativando-a e regulando a concentração do neurotransmissor na fenda sináptica. Essa enzima contém uma unidade catalítica conhecida por tríade, composta por serina, histidina e glutamato, que se localiza no interior da enzima (SOREQ e SEIDMAN, 2001). A AChE apresenta duas formas moleculares: forma assimétrica, localizada na

junção neuromuscular e a forma globular, existente como monômeros, dímeros ou tetrâmeros catalíticos e localizam-se no SNC (TALESA, 2001).

A ACh é responsável por várias funções por todo o organismo, dentre os quais, destacam-se: vasodilatação (pela liberação de óxido nítrico), contração e miose, secreção salivar, bradicardia e no controle da transmissão de impulsos nervosos através de sinapses colinérgicas (TAYLOR e BROWN, 1994; MILATOVIC e DETTBARN, 1996).

A inibição da AChE tem sido amplamente estudada já que, clinicamente, uma moderada inibição dessa enzima representa um tratamento efetivo em várias doenças tais como a doença de Alzheimer e a *miastenia gravis* (SOREQ e SEIDMAN, 2001). Por outro lado, sabe-se que a inibição dessa enzima pode ser fatal, já que alguns inibidores são extremamente tóxicos para as células tais como, o veneno de cobra e pesticidas como o paration e malation (SHEN et al., 2002).

Inúmeros estudos tem sido realizados a fim de esclarecer mecanismos de inibição e a sua importância clínica. Dessa forma, Taylor e Brown (1994) mostraram que a inibição da AChE causa paralisia. Além disso, Olney e colaboradores (1986) mostraram que a inibição dessa enzima pode causar também hiperatividade, convulsões e epilepsia. Além disso, a AChE está inibida em modelos experimentais de isquemia cerebral e doença de Alzheimer (SCHETINGER et al., 1999; TALESA, 2001). Dados na literatura também mostram que os radicais livres (TSAKIRIS et al., 2000) e alguns antidepressivos também inibem a AChE (MÜLLER et al., 2002).

Estudos em nosso laboratório mostraram que a prolina e a arginina, metabólitos acumulados na hiperprolinemia tipo II e na hiperargininemia (EIM)

reduziram a atividade da AChE em córtex cerebral de ratos (DELWING et al., 2003; WYSE et al., 2003). Já foi demonstrado também que a metilguanidina, um CG, inibe a atividade da AChE em cérebro de ratos (MATSUMOTO et al., 1977).

2. OBJETIVOS

Com a finalidade de compreender melhor os mecanismos da deficiência de GAMT, e considerando os danos neurológicos encontrados na doença, bem como a importância do estriado devido as alterações nos gânglios da base e do hipocampo devido ao retardo metal observado nos pacientes com essa deficiência os objetivos desse trabalho foram:

1. Investigar o efeito *in vitro* do guanidino acetato sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase e da Mg^{2+} -ATPase em membrana plasmática sináptica em estriado de ratos.
2. Verificar o efeito *in vitro* do guanidino acetato sobre a atividade da AChE em homogeneizado de estriado de ratos.
3. Estudar o mecanismo de inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase causada pelo guanidino acetato em estriado de ratos.
4. Estudar a interação entre guanidino acetato e o ácido arginínico (AA) sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em estriado de ratos.
5. Investigar o efeito do guanidino acetato *in vitro* sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase e AChE em hipocampo de ratos.
6. Investigar o papel dos antioxidantes glutathiona (GSH), trolox, N^ω -nitro-L-arginina metilester (L-NAME) e da taurina sobre a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase causada pelo guanidino acetato em hipocampo de ratos.

3. RESULTADOS

Artigo 1

Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat striatum by guanidinoacetate

Alexandra I. Zugno, Francieli M. Stefanello, Emilio L. Streck, Thiago Calcagnotto, Clóvis M. D. Wannmacher, Moacir Wajner and Angela T. S. Wyse.

International Journal of Developmental Neuroscience. 2003 Jun; 21(4):183-189.

Artigo 2

Taurine and L-NAME prevent the inhibition of hippocampal Na⁺,K⁺-ATPase activity caused by guanidinoacetate

Alexandra I. Zugno, Renata Franzon, Fábria Chiarani, Caren S. Bavaresco, Clóvis M. D. Wannmacher, Moacir Wajner and Angela T.S. Wyse.

Artigo submetido para a revista Neurochemical Research

4. DISCUSSÃO

A deficiência de GAMT é uma doença autossômica recessiva do metabolismo da creatina (STÖCKLER et al., 1994; VON FIGURA et al., 2001) e se caracteriza bioquimicamente pela diminuição de creatina e pelo acúmulo de guanidino acetato nos tecidos dos pacientes afetados (SCHULZE et al., 1997). Essa doença manifesta-se nos primeiros meses de vida, e os sintomas principais são retardo mental e epilepsia. Os sintomas neurológicos incluem movimentos involuntários extrapiramidais, provavelmente causado pelas lesões nos gânglios da base (VON FIGURA et al., 2001).

Embora se saiba pouco sobre os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelos danos neurológicos da deficiência de GAMT, sabe-se que a redução nos níveis cerebrais de creatina contribui para tais disfunções (MORI et al., 1996; MALCON et al., 2000). A importância dessa redução é evidenciada por relatos que mostram que a suplementação oral de creatina em pacientes portadores da deficiência de GAMT aumenta os níveis de creatina e fosfocreatina no cérebro, apresentando efeitos benéficos sobre as manifestações clínicas como, por exemplo, atraso no desenvolvimento, fraqueza muscular e hipotonia. Por outro lado, a suplementação de creatina não provoca melhora das crises epiléticas apresentada pelos pacientes (STÖCKLER et al., 1996). Portanto, considerando que nos pacientes com deficiência de GAMT ocorre diminuição dos níveis de creatina e aumento de guanidino acetato, seu precursor imediato, e que a suplementação oral com creatina não foi capaz de diminuir as alterações neurológicas, sugere-se que os danos neurológicos sejam causados pelo acúmulo de guanidino acetato.

Estudos da literatura mostram que o acúmulo de guanidino acetato provoca danos ao SNC, já que o mesmo é capaz de produzir espécies reativas de oxigênio (MORI et al., 1996). Além disso, o guanidino acetato é considerado um potente agente epileptogênico (SCHULZE et al., 2001). Essas observações concordam com o possível papel deste composto nas disfunções neurológicas encontradas da deficiência de GAMT (SCHULZE et al., 1997; SCHULZE et al., 2001).

Uma das enzimas estudadas neste trabalho foi a Na^+, K^+ -ATPase, uma enzima que desempenha um papel fundamental no SNC, mantendo os níveis iônicos cerebrais necessários para a excitabilidade neuronal, além de regular o volume e o pH intracelulares (GEERING, 1990). A Na^+, K^+ -ATPase consome de 40 a 60% do ATP formado no cérebro (ERECINSKA e SILVER, 1994).

Foi demonstrado que a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase está relacionada com a disfunção neurológica (LEES, 1991). Além disso, sabe-se que a enzima está inibida durante as crises convulsivas (RENKAWEK et al., 1992), na epilepsia (GRISAR et al., 1992), na doença de Alzheimer (LIGURI et al., 1990; HATTORI et al., 1998) e na isquemia cerebral (WYSE et al., 2000b). Estudos realizados em nosso laboratório mostram que a atividade dessa enzima está diminuída em alguns modelos de EIM (WYSE et al., 1998a; WYSE et al., 2000a; PONTES et al., 2001; STRECK et al., 2002a).

A AChE é uma importante enzima regulatória que controla a transmissão de impulsos nervosos através de sinapses colinérgicas pela hidrólise da acetilcolina (MILATOVIC e DETTBARN, 1996; SCHETINGER et al., 2000), e apresenta um papel fundamental na cognição (EVERITT e ROBBINS, 1997).

Dados da literatura mostram a importância do sistema colinérgico em doenças neurodegenerativas. Na doença de Alzheimer, por exemplo, ocorre uma diminuição da atividade da AChE cerebral devido à mudanças na distribuição da enzima no cérebro e que dificultam a transmissão sináptica (TALESA, 2001). Além disso, fármacos antidepressivos e metilguanidina inibem a atividade dessa enzima (MATSUMOTO et al., 1977; MÜLLER et al., 2002). Estudos recentes em nosso laboratório mostraram que ratos submetidos ao modelo experimental agudo de hiperprolinemia e de hiperargininemia apresentam um decréscimo na atividade da AChE (DELWING et al., 2003; WYSE et al., 2003).

Considerando a importância da Na^+, K^+ -ATPase e da AChE para o funcionamento normal do SNC e que os pacientes com deficiência de GAMT apresentam disfunção neurológicas importantes, como o retardo mental, neste trabalho investigou-se o efeito *in vitro* do guanidino acetato sobre as atividades dessas enzimas em estriado de ratos.

O estriado foi utilizado devido às lesões nos gânglios da base encontradas na deficiência de GAMT (VON FIGURA et al., 2001). Nossos resultados mostraram que o guanidino acetato inibe significativamente a atividade da Na^+, K^+ -ATPase (43%), com inibição máxima na concentração de 10 mM. Além disso, verificou-se que o guanidino acetato não altera as atividades da Mg^{2+} -ATPase (ATPases insensíveis à ouabaína) e AChE, sugerindo um efeito específico desse composto sobre a Na^+, K^+ -ATPase.

Considerando que trabalhos prévios realizados em nosso laboratório mostram que o CG ácido arginínico, inibe a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em cérebro de ratos (SILVA et al., 1999), decidimos investigar a interação entre os

CG guanidino acetato e ácido arginínico. Primeiramente, verificamos o efeito de diferentes concentrações do ácido arginínico sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em membrana de estriado de ratos. Os resultados mostraram que o ácido arginínico inibiu a atividade da Na^+, K^+ -ATPase (57%) em estriado de ratos com uma inibição máxima na concentração de 5 mM e não alterou a atividade da Mg^{2+} -ATPase.

Posteriormente, foi realizado o estudo de interação entre esses dois compostos. O modelo proposto por Chevillard e colaboradores (1993) foi utilizado para verificar essa interação. Esse modelo é feito variando as concentrações dos dois compostos escolhidos, sendo que uma é crescente e outra decrescente. As concentrações testadas de cada composto foram escolhidas de acordo com a porcentagem de inibição, que deve ser semelhante (3,0 mM para os dois compostos, com uma inibição de aproximadamente 30%). Um gráfico mostrando uma reta indica que as substâncias atuam no mesmo sítio de ligação da enzima. O guanidino acetato e o ácido arginínico apresentaram este perfil mostrando que inibem a enzima provavelmente no mesmo sítio, sugerindo um mecanismo de ação similar. Esses resultados concordam com achados prévios de nosso laboratório que mostram que outros CG, os quais estão aumentados na hiperargininemia, tais como ácido arginínico, homoarginina, N-acetilarginina, inibem a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em membrana plasmática sináptica de córtex de ratos atuando no mesmo sítio da enzima (SILVA et al., 1999).

Nesse trabalho também foi realizado um estudo cinético da inibição do guanidino acetato sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, a fim de melhor compreender o mecanismo de inibição desse composto. Nossos resultados

mostraram que o guanidino acetato inibe a atividade da enzima de uma forma incompetitiva com o ATP. O valor de K_m aparente (constante de Michaelis-Menten) e a V_{max} (velocidade máxima) foram de 0,20 mM e 0,82 mmol de Pi liberado por minuto por miligrama de proteína, mostrando que esses valores diminuiram com o aumento da concentração de guanidino acetato e representando assim, a inibição. O valor de K_i (constante de inibição) obtido foi de 7.18 mM.

Evidências na literatura sugerem que alterações na atividade da Na^+, K^+ -ATPase podem ser responsáveis por mecanismos de toxicidade em neurônios (LEES, 1993). Nesse contexto, foi demonstrado que administrações de ouabaína, um inibidor específico da Na^+, K^+ -ATPase de 0,1 nM produzem necrose celular e infarto (LEES et al., 1990). Estudos também mostram que doses de ouabaína variando de 0,05 a 0,5 μM inibem em até 30% a atividade da Na^+, K^+ -ATPase (SWEADNER, 1979), provocando um aumento da recaptção do sódio e cálcio livre (SATOH e NAKAZATO, 1992). Previamente, estudos realizados no nosso laboratório demonstraram que uma diminuição significativa da atividade da Na^+, K^+ -ATPase é provocada por inúmeros metabólitos acumulados em EIM, como por exemplo fenilalanina, ácido propiônico, ácido metilmalônico, prolina, homocisteína e ácido glutárico (WYSE et al., 1995; WYSE et al., 1998a; WYSE et al., 1998b; PONTES et al., 1999; WYSE et al., 2000a; PONTES et al., 2001; KÖLKER et al., 2002; STRECK et al., 2002b).

Relatos da literatura mostraram que as lesões encontradas após crises epiléticas, isquemia cerebral, hipoglicemia e traumas, alteram a atividade da Na^+, K^+ -ATPase. Tais alterações podem ser a possível explicação para o

aumento do glutamato e respectivos agonistas (BEN-ARI, 1985; CHOI e ROTHMAN, 1990). De acordo com esses achados, estudos mostram que a inibição da atividade da Na^+,K^+ -ATPase pode levar à morte celular por mecanismos dependentes de excitotoxinas endógenas, como o glutamato (COUSIN et al., 1995; LEES e LEONG, 1995). Considerando estudos em nosso laboratório demonstrando a inibição na atividade da Na^+,K^+ -ATPase por CG, bem como os achados de outros pesquisadores sugerindo o guanidino acetato um importante agente epileptogênico, (SCHULZE et al., 2001), é possível considerar o efeito neurotóxico do guanidino acetato sobre a atividade da Na^+,K^+ -ATPase como um possível mecanismo, causando excitotoxicidade.

Dados da literatura mostram que a metilguanidina e outros CG induzem convulsões (MATSUMOTO et al., 1976) e são capazes de inibir as atividades da AChE e Na^+,K^+ -ATPase (MATSUMOTO et al., 1976; MATSUMOTO et al., 1977). De acordo com esses resultados, foi também testado o efeito *in vitro* do guanidino acetato sobre a atividade da AChE em homogeneizado de ratos. Os resultados mostraram que esse composto não altera a atividade dessa enzima em nenhuma das concentrações testadas.

Em uma segunda parte do nosso estudo, foram investigadas efeitos de diferentes concentrações de guanidino acetato similares às aquelas encontradas nos pacientes com deficiência de GAMT, sobre as atividades das ATPases e da AChE em hipocampo de ratos jovens. O hipocampo foi utilizado devido à importância desta estrutura para a memória e aprendizado e pelo fato de pacientes com a deficiência de GAMT apresentarem retardo mental. Da mesma forma, como na primeira parte do trabalho, o guanidino acetato provocou uma inibição significativa (40%), na concentração mais alta, sobre a atividade da

Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo de ratos *in vitro*. Por outro lado, esse composto não alterou a atividade da Mg^{2+} -ATPase, sugerindo um efeito específico sobre a Na^+, K^+ -ATPase.

Considerando que a Na^+, K^+ -ATPase é inibida por radicais livres (LEES, 1993), lipoperoxidação (MISHRA et al., 1989; VIANNI et al., 1991), óxido nítrico (SATO et al., 1995), que os grupos SH das proteínas são sensíveis ao estresse oxidativo (YUFU et al., 1993), e que evidências na literatura mostram que o guanidino acetato e outros CG aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (MORI et al., 1996), decidimos verificar o efeito da pré-incubação de homogeneizados de hipocampo de ratos com o guanidino acetato na presença ou ausência dos antioxidantes, tais como o trolox (um agente protetor da lipoperoxidação), GSH (agente protetor de grupos SH), L-NAME (inibidor da óxido nítrico sintase) e taurina (um antioxidante e estabilizador de membrana), com o objetivo de investigar se a inibição da Na^+, K^+ -ATPase causada por guanidino acetato seria por produção de radicais livres.

Verificou-se que a incubação de homogeneizados de hipocampo com guanidino acetato inibiu a atividade da Na^+, K^+ -ATPase (25%) e não alterou a atividade da Mg^{2+} -ATPase. Também foi verificado que o trolox, GSH, L-NAME e taurina *per se* não alteraram a atividade da Na^+, K^+ -ATPase. Por outro lado, a taurina e o L-NAME, mas não o trolox e o GSH, foram capazes de prevenir o efeito inibitório causado pelo guanidino acetato sobre a atividade da enzima.

Assim como a Na^+, K^+ -ATPase, a inibição da AChE também é associada à neurotoxicidade. Estudos mostram que essa enzima também é inibida por radicais livres (TSAKIRIS et al., 2000). Dessa forma, a atividade da AChE

também foi analisada e, assim como no primeiro estudo, não houve alteração na atividade da enzima.

Também foi testado o efeito *in vitro* do guanidino acetato sobre o TBARS em hipocampo de ratos a fim de verificar se o efeito inibitório desse composto sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase estaria relacionado com a lipoperoxidação da membrana, baseado no fato de que o guanidino acetato aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio. Nossos resultados mostraram que o guanidino acetato não altera a produção de TBARS, indicando que o composto não induz a lipoperoxidação. Esses achados concordam com os nossos resultados mostrando que o trolox não previne o efeito inibitório do guanidino acetato sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase.

O mecanismo de inibição da Na^+, K^+ -ATPase causado pelo guanidino acetato não está completamente elucidado. No entanto, nossos resultados mostraram que o L-NAME e a taurina, que inibem a óxido nítrico sintase (MARCINKIEWICZ et al., 1995; QI et al., 1995), previnem o efeito inibitório sobre a Na^+, K^+ -ATPase causado pelo guanidino acetato, sugerindo o envolvimento do óxido nítrico na inibição da enzima. Tal efeito pode ser mediado por uma excessiva estimulação de receptores NMDA (LEES, 1993), que aumenta o influxo de cálcio (LEES, 1993) e a síntese de óxido nítrico por ativação da enzima óxido nítrico sintase (VINCENT e HOPE, 1992). Nesse contexto, foi demonstrado que a taurina atenua os efeitos da estimulação de receptores NMDA após administração de amônia em ratos (HILGIER et al., 2003). Além disso, nossos resultados estão de acordo com dados de Avrova e colaboradores (1999), mostrando que a pré-incubação de sinaptossomas com L-NAME previne a inibição da Na^+, K^+ -ATPase causada pelo glutamato.

A taurina tem sido amplamente estudada devido as suas diversas funções, tais como neuroprotetor, antioxidante e modulador de cálcio (PETROSIAN e HAROUTOUNIAN, 2000). Evidências na literatura mostram que a taurina age como estabilizador de membrana prevenindo a inibição da Na^+, K^+ -ATPase em retina de ratos diabéticos (DI LEO et al., 2002), e em membrana de eritrócitos expostos ao ozônio e colesterol (QI et al., 1995). A taurina também tem ação antioxidante (MAN'KOV'S'KA, et al., 1998), inibe a formação de óxido nítrico (HANN et al., 2000; EL-ABHAR e ABAD EL GAWAD, 2003). Além disso, foi demonstrado que a taurina tem ação anti-epileptogênica em modelos animais experimentais (HUXTABLE e LARID, 1978) e em humanos (BERGAMINI et al., 1974) e que tal efeito pode estar atribuído à modulação de cálcio por esse aminoácido (KENDLER, 1989; BIRDSALL, 1998).

Dessa forma, nossos resultados sugerem que a taurina age como um estabilizador de membrana plasmática sináptica na qual a Na^+, K^+ -ATPase está inserida, impedindo o efeito inibitório do guanidino acetato sobre a atividade dessa enzima.

Considerando que a Na^+, K^+ -ATPase é importante para o funcionamento normal do SNC, que a redução da atividade dessa enzima está relacionada com danos neurológicos (COUSIN, 1995; LEES, 1990) que o guanidino acetato possui um grande potencial epileptogênico em humanos (SCHULZE et al., 1997), e foi capaz de diminuir significativamente a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, é possível que a redução da atividade dessa enzima seja um dos mecanismos pelos quais esse composto é neurotóxico causando disfunções neurológicas características de indivíduos com a deficiência de GAMT.

5. CONCLUSÕES

1. O guanidino acetato *in vitro* inibiu a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase, mas não alterou a atividade da Mg²⁺-ATPase de membrana plasmática sináptica em estriado de ratos.
2. O guanidino acetato e o ácido arginínico inibiram a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase, provavelmente atuando no mesmo sítio de ligação.
3. O guanidino acetato inibiu a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase de forma acompetitiva com o ATP.
4. O guanidino acetato *in vitro* não alterou a atividade da AChE em homogeneizado de ratos em nenhuma das concentrações testadas.
5. A pré-incubação de homogeneizados de ratos com guanidino acetato inibiu a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase de membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos.
6. O L-NAME e a taurina preveniram a inibição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase causado pelo guanidino acetato em hipocampo de ratos, mas o trolox e o GSH não preveniram tal efeito.
7. O guanidino acetato não alterou o TBARS em hipocampo de ratos.
8. A inibição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase pelo guanidino acetato parece ser um dos mecanismos envolvidos na disfunção neuronal observada nos pacientes com a deficiência de GAMT.

6. PERSPECTIVAS

1. Investigar o efeito da administração de guanidino acetato sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em cérebro de ratos.
2. Verificar a atividade da AChE em cérebro e sangue de ratos submetidos à administração de guanidino acetato.
3. Investigar o efeito *in vitro* e *in vivo* do guanidino acetato sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos.
4. Estudar parâmetros comportamentais em ratos submetidos à administração de guanidino acetato.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVROVA, N.F.; SHESTAK, K.I.; ZAKHAROVA, I.O.; SOKOLOVA, T.V.; LEONT'EV, V.G. (1999). The difference in the effect of glutamate and NO synthase inhibitor on free calcium concentration and Na⁺,K⁺-ATPase activity in synaptosomes from various brain regions. **Neurochem. Res.** 24: 1101-1106.
- BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J.; MARSHALL, P.A.; FREEMAN, B.A. (1990). Apparent hydroxyl radical reduction by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 87: 1620-1624.
- BEN ARI, Y. (1985). Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. **Neuroscience** 14: 375-403.
- BENSON, P.F.; FENSON, A.H. (1985). **Genetic Biochemical Disorders**. Oxford: University Press.
- BERGAMINI, L.; MUTANI, R.; DELSEDIME, M.; DURELLI, L. (1974). First clinical experience on the antiepileptic action of taurine. **Neurology** 11: 261-269.
- BIRDSALL, T.C. (1998). Therapeutic applications of taurine. **Altern. Med. Rev.** 3: 128-133.
- BLANCO, G.; MERCER, R.W. (1998). Isozymes of the Na⁺,K⁺-ATPase: heterogeneity in structure, diversity and function. **Am. J. Physiol.** 275: F633-F650.

- BLANCO, G.; SÁNCHEZ, G.; MELTON, R.J.; TOURTELLOTTE, W.G.; MERCER, R.W. (2000). The $\alpha 4$ isoform of the Na,K-ATPase is expressed in the germ cells of the testes. **J. Histochem. Cytochem.** 48: 1023-1032.
- CHAE, Y.J.; CHUNG, C.E.; KIM, B.J.; LEE, M.H.; LEE, H. (1998). The gene encoding guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) maps to human chromosome 19 at band p13.3 and mouse chromosome 10. **Genomics** 49: 162-164.
- CHEVILLARD, C.; CÁRDENAS, M.L.; CORNISH-BOWDEN, A. (1993). The competition plot: a simple test of whether two reactions occur at the same active site. **Biochem. J.** 289: 599-604.
- CHOI D.W.; ROTHMAN, S.M. (1990). The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. **Ann. Rev. Neurosci.** 13: 171-182.
- COUSIN, M.A.; NICHOLLS, D.G.; POCOCK, J.M. (1995). Modulation of ion gradients and glutamate release in cultured cerebellar granule cells by ouabain. **J. Neurochem.** 64: 2097-2104.
- DE DEYN, P.P.; MARESCAU, B.; LORNOY, W.; BECAUS, I.; LOWENTHAL, A.; (1986). Guanidino compounds in uraemic dialysed patients. **Clin. Chim. Acta** 157: 143-150.
- DE DEYN, P.P.; MARESCAU, B.; MACDONALD, R.L. (1991). Guanidino compounds that are increased in hyperargininemia inhibit GABA and glycine responses on mouse neurons in cell culture. **Epilepsy Res.** 8: 134-141.
- DELWING, D.; CHIARANI, F.; DELWING, D.; BAVARESCO, C.S.; WANNMACHER, C.M.D.; WAJNER, M.; WYSE, A.T.S. (2003). Proline

- reduces acetylcholinesterase activity in cerebral cortex of rats. **Met. Brain Dis.** 18: 79-86.
- D'HOOGE, R.; DE DEYN, P.P.; VAN DE VIJVER, G.; ANTOONS, G.; RAES, A.; VAN BOGAERT, P.P. (1999). Uraemic guanidino compounds inhibit gamma-aminobutyric acid-evoked whole cell currents in mouse spinal cord neurones. **Neurosci. Lett.** 265: 83-86
- DI LEO, M.A.; MANTINI, S.A.; CERCONE, S.; LEPORE, D.; GENTILONI SILVERI, N.; CAPUTO, S.; GRECO, A.V.; GIARDINA, B.; FRANCONI, F.; GHIRLANDA, G. (2002). Chronic taurine supplementation ameliorates oxidative stress and Na⁺,K⁺-ATPase impairment in the retina of diabetic rats. **Amino Acids** 23: 401-406.
- EGGLETON, P.; EGGLETON, G.P. (1927). The inorganic phosphate and a labile form of organic phosphate in the gastrocnemius of the frog. **Biochem.** 21: 190-195.
- EL-ABHAR, H.S.; ABAD EL GAWAD, H. (2003). Modulation of cortical nitric oxide synthase, glutamate and redox state by nifedipime and taurine in PTZ-kindled mice. **Epilepsia** 44: 276-281.
- ERECINSKA, M.; DAGANI, F. (1990). Relationships between the neuronal sodium/potassium pump and energy metabolism. **J. Gen. Physiol.** 95: 591-616.
- ERICINSKA, M.; SILVER, I.A. (1994). Silver, ions and energy in mammalian brain. **Prog. Neurobiol.** 16: 37-71.
- EVERITT, B.J.; ROBBINS, T.W. (1997). Central cholinergic systems and cognition. **Annu. Rev. Psychol.** 48: 649-684.

- GEERING, K. (1990): Subunit assembly and functional maturation of Na⁺,K⁺-ATPase. **J. Membr. Biol.** 115: 109-121.
- GIUGLIANI, R. (1988). Erros inatos do metabolismo: uma visão panorâmica. **Pediatria Moderna.** 23: 29-40.
- GLYNN, I.M. (1993). All hands on the sodium pump. **J. Cell. Biol.** 110: 165-174.
- GRISAR, T. (1984). Glial and neuronal Na⁺,K⁺ pump in epilepsy. **Ann. Neurol.** 16: S128-S134.
- GRISAR, T.; GUILLAUME, D.; DELGADO-ESCUETA, A.V. (1992). Contribution of Na⁺,K⁺-ATPase to focal epilepsy: a brief review. **Epilepsy Res.** 12: 141-149.
- GUIMBAL, C.; KILIMANN, M.W. (1993). A Na⁺-dependent creatine transporter in rabbit brain, muscle, heart and kidney. CDNA cloning and functional expression. **J. Biol. Chem.** 268: 8418-8421.
- HANN, D.; YAMADA, K.; SENZAKI, K.; XIONG, H.; NAWA, H.; NABESHIMA, T. (2000). Involvement of nitric oxide in pentylentetrazole-induced kindling in rats. **J. Neurochem.** 74: 792-798.
- HATTORI, N.; KITAGAWA, K.; HIGASHIDA, T.; YAGYU, K.; SHIMOHAMA, S.; WATAYA, T.; PERRY, G.; SMITH, M.A.; INAGAKI, C. (1998). Cl⁻ ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase activities in Alzheimer's disease brains. **Neurosci. Lett.** 254: 141-144.
- HILGIER, W.; ANDERZHANOVA, E.; OJA, S.S.; SARANSAARI, P.; ALBRECHT, J. (2003). Taurine reduces ammonia and N-methyl-D-aspartate-induced accumulation of cyclic MP and hydroxyl radicals in microdialysates of the rat striatum. **Eur. J. Pharmacol.** 468: 21-25.

- HUNNEMAN, D.H.; HANEFELD, F. (1997). GC-MS determination of guanidinoacetate in urine and plasma. **J. Inherit. Metab. Dis.** 20: 450-452.
- HUXTABLE, R.; LARID, H. (1978). The prolonged anticonvulsivant action of taurine on genetically determined seizure - susceptibility. **Can. J. Neurol. Sci.** 5: 215-221.
- JENNE, D.E.; OLSEN, A.S.; ZIMMER, M. (1997). The human guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) gene maps to a syntenic region on 19p13.3, homologous to band C of mouse chromosome 10, but GAMT is not mutated in jittery mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 238: 723-727.
- KAPLAN, J.H. (2002). Biochemistry of Na⁺,K⁺-ATPase. **Ann. Rev. Biochem.** 71: 511-535.
- KENDLER, B.S. (1989). Taurine: an overview of its role in preventive medicine. **Prev. Med.** 18: 79-100.
- KÖLKER, S.; OKUN, J.G.; AHLEMEYER, B.; WYSE, A.T.S.; HÖLSTER, F.; WAJNER, M.; KOHLMÜLLER, D.; MAYATEPEK, E.; KRIEGLSTEIN, J.; HOLLFFMAN, G.F. (2002). Chronic treatment with glutaric acid induces partial tolerance to excitotoxicity in neuronal cultures from chick embryo telencephalons. **J. Neurosci. Res.** 68: 424-431.
- KREBS, H.A.; HENSELEIT, K. (1932). Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. Hoppe-Seyler's. Z. **Physiol. Chem.** 210: 33-66.
- KURELLA, E.G.; TYULINA, O.V.; BOLDYREV, A.A. (1999). Oxidative resistance of Na/K-ATPase. **Cell. Mol. Neurobiol.** 19: 133-140.

- LEES, G.J. (1991). Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. **Brain Res. Brain Res. Rev.** 16: 283-300.
- LEES, G.J. (1993). Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. **Neuroscience** 54: 287-322.
- LEES, G.J.; LEHMANN, A.; SANDBERG, M.; HAMBERGER, A. (1990). The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in rat hippocampus. **Neurosci. Lett.** 120: 159-162.
- LEES, G.J.; LEONG, W. (1995). Brain lesions induced by specific and non-specific inhibitors of sodium-potassium ATPase. **Brain Res.** 649: 225-233.
- LEUZZI, V.; BIANCHI, M.C.; TOSETTI, M.; CARDUCCI, C.; CERQUIGLINI, C.A.; CIONI, G.; ANTONOZZI, I. (2000). Brain creatine depletion: Guanidinoacetate methyltransferase deficiency (improving with creatine supplementation). **Neurology** 55: 1407-1409.
- LIGURI, G.; TADDEI, N.; NASSI, P.; LATORRACA, S.; NEDIANI, C.; SORBI, S. (1990). Changes in Na⁺,K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase and some soluble enzymes related to energy metabolism in brains of patients with Alzheimer's disease. **Neurosci. Lett.** 112: 338-342.
- LINGREL, J.B.; KUNTZWEILER, T. (1994). Na⁺,K⁺-ATPase. **J. Biol. Chem.** 269: 19659-19662.
- MALCON, C.; KADDURAH-DAOUK R.; BEAL, M.F. (2000). Neuroprotective effects of creatine administration against NMDA and malonate toxicity. **Brain Res.** 96: 195-198.

- MAN'KOV'S'KA, I.M.; SEREDENKO, M.M.; VAVILOVA, H.L.; KHARLAMOVA, O.M.; BYSTRIUKOV, V.O. (1998). The antioxidant action of taurine in acute hypoxia. **Fiziol. Zh.** 44: 65-72.
- MARCINKIEWICZ, J.; GRABOWSKA, A.; BERETA, J.; STELMASZYNSKA, T. (1995). Taurine chloramine, a product of activated neutrophils, inhibits in vitro the generation of nitric oxide and other macrophage inflammatory mediators. **J. Leukoc. Biol.** 58: 667-674.
- MARESCAU, B.; DE DEYN, P.P.; WIECHERT, P.; VAN GORP, L.; LOWENTHAL, A. (1986). Comparative study of guanidino compounds in serum and brain of mouse, rat, rabbit and man. **J. Neurochem.** 46: 717-720.
- MARESCAU, B.; DESHMUKH, D.R.; KOCKX, M.; POSSEMIERS, I.; QURESHI, I.A.; WIECHERT, P.; DE DEYN, P.P. (1992). Guanidino compounds in serum, urine, liver, kidney and brain of man and some urotelic animals. **Metabolism** 41: 526-532.
- MATSUMOTO, M.; FUJIWARA, M.; MORI, A.; ROBIN, Y. (1977). Effet des dérivés guanidiques sur la cholinestérase et sur l' acétylcholinestérase du cerveau de lapin. **Comp. Rend. Soc. Biol.** 171: 1226-1229.
- MATSUMOTO, M.; KOBAYASHI, K.; KISHIKAWA, H.; MORI, A. (1976). Convulsive activity of methylguanidine in cat and rabbits, **IRCS Med. Sci.** 4: 65.
- MILATOVIC, D.; DETTBARN, W-D. (1996). Modification of acetylcholinesterase during adaptation to chronic, subacute paraoxon application in rat. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 136: 20-28.

- MISHRA, O.P.; DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M.; CAHILLANE, G.; WAGERLE, L.C. (1989). Lipid peroxidation as the mechanism of modification of the affinity of the Na⁺,K⁺-ATPase activity sites for ATP, K⁺, Na⁺, and strophanthidin in vitro. **Neurochem. Res.** 14: 845-851.
- MORI, A.; KOHNO, M.; MASUMIZU, T.; NODA, Y.; PACKER, L. (1996). Guanidino compounds generate reactive oxygen species. **Biochem. Mol. Int.** 40: 135-143.
- MÜLLER, T.C.; ROCHA, J.B.T.; MORSCH, V.M.; NEIS, R.N.; SCHETINGER, M.R.C. (2002). Antidepressants inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity. **Biochim. Biophys. Acta** 1587: 92-98.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. (2000). **Lehninger Principles of Biochemistry**. New York: Worth Publishers, Inc., 3rd Ed.
- NEU, A.; NEUHOFF, H.; TRUBE, G.; FEHR, S.; ULLRICH, K.; ROEPER, J.; ISBRANDT, D. (2002). Activation of GABA_A receptors by guanidinoacetate: a novel pathophysiological mechanism. **Neurobiol. Disease** 11: 298-307.
- OLNEY, J.W.; COLLINS, R.C.; SLOVITER, R.S. (1986). Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage. **Adv. Neurol.** 44: 857-877.
- PETROSIAN, A.M.; HAROUTOUNIAN, J.E. (2000). Taurine as a universal carrier of lipid soluble vitamins: a hypothesis. **Amino Acids** 19: 409-421.
- PONTES, Z.L.; OLIVEIRA, L.S.; BAVARESCO, C.S.; STRECK, E.L.; DUTRA-FILHO, C.S.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D.; WYSE, A.T.S. (1999). Proline administration decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in the synaptic plasma membrane from cerebral cortex of rats. **Metab. Brain Dis.** 14: 265-272.

- PONTES, Z.L.; OLIVEIRA, L.S.; FRANZON, R.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D.; WYSE, A.T.S. (2001). Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase from rat hippocampus by proline. **Neurochem. Res.** 26: 1321-1326.
- QI, B.; YAMAGAMI, T.; NARUSE, Y.; SOKEJIMA, KAGAMIMORI, S. (1995). Effects of taurine on depletion of erythrocyte membrane Na⁺,K⁺-ATPase activity due to ozone exposure or cholesterol enrichment. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.** 41: 627-634.
- REIS, E.A.; OLIVEIRA, L.S.; LAMMERS, M.L.; NETTO, C.A.; WYSE, A.T.S. (2002). Arginine administration inhibits hippocampal Na⁺,K⁺-ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. **Brain Res.** 951: 151-157.
- RENKAWEK, K.; RENIER, W.O.; DE PONT, J.J.; VOGELS, O.J.; GABREELS, F.J. (1992). Neonatal status convulsivus, spongiform encephalopathy, and low activity of Na⁺/K⁺-ATPase in the brain. **Epilepsia** 33: 58-64.
- RICHARD, V.; HENRY, J.P.; THUILLEZ, C. (1994). Is guanidino succinate a precursor for nitric oxide synthesis in rat vascular tissue? **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 24: 50-54.
- SATOH, E.; NAKASATO, Y. (1992). On the mechanism of ouabain-induced released of acetylcholine from synaptosomes. **J. Neurochem.** 58: 1038-1044.
- SATO, T.; KAMATA, Y.; IRIFUNE, M.; NISHIKAWA, T. (1995). Inhibition of purified Na⁺,K⁺-ATPase activity from porcine cerebral cortex by NO generating drugs, **Brain Res.** 704: 117-120.

- SCHETINGER, M.R.; BONAN, C.D.; FRASSETO, S.S.; WYSE, A.T.S.; SCHIERHOLD, R.C.; WEBBER, A.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F.; NETTO, C.A. (1999). Pre-conditioning to global cerebral ischemia changes hippocampal acetylcholinesterase in the rat. **Biochem. Mol. Biol. Int.** 47: 473-478.
- SCHETINGER, M.R.C.; PORTO, N.M.; MORETTO, M.B.; MORSCH, V.M.; ZANATTA, J.B.T.N. (2000). New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATP-Dase activities. **Neurochem. Res.** 25: 949-955.
- SCHULZE, A.; EBINGER, F.; RATING, D.; MAYATEPEK, E. (2001). Improving treatment of guanidinoacetate methyltransferase deficiency: reduction of guanidinoacetic acid in body fluids by arginine restriction and ornithine supplementation. **Mol. Genet. Metab.** 74: 413-419.
- SCHULZE, A.; HESS, T.; WEVERS, R.; MAYATEPEK, E.; BACHERT, P.; MARESCAU, B.; KNOPP, M.V.; DE DEYN, P.P.; BREMER, H.J.; RATING, D. (1997). Creatine deficiency syndrome caused by guanidinoacetate methyltransferase deficiency: diagnostic tools for a new inborn error of metabolism. **J. Pediatr.** 131: 626-31.
- SCHULZE, A.; MAYATEPEK, E.; RATING, D.; BREMER, H.J. (1996). Sakaguchi reaction: A useful method for screening guanidinoacetate methyltransferase deficiency. **J. Inherit. Metab. Dis.** 19: 706.
- SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S; VALLE, D. (eds.) (2001). **The metabolic and molecular bases of inherited disease.** New York: McGraw-Hill, 8th Ed.

- SHEN, T.; TAI, K.; HENCHMAN, R.H.; McCAMMON, J.A. (2002). Molecular dynamics of acetylcholinesterase. **Acc. Chem. Res.** 35: 332-340
- SHIROKANE, Y.; UTSUSHIKAWA, M.; NAKAJIMA, M. (1991). A new enzymatic determination of guanidinoacetic acid. **Clin. Chim. Acta** 202: 227-236.
- SILVA, C.G.; PAROLO, E.; STRECK, E.L.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D; WYSE, A.T.S. (1999). In vitro inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity from rat cerebral cortex by guanidino compounds accumulating in hyperargininemia. **Brain Res.** 838: 78-84.
- SKOU, J.C.; ESMANN, M. (1992). The Na⁺,K⁺-ATPase. **J. Bioenerg. Biomembr.** 24: 249-261.
- SKOU, J.C. (1957). The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. **Biochim. Biophys. Acta** 23: 394-401.
- SOLOMON, E.P.; BERG, L.R.; MARTIN, D.W.; VILLEE, C. (1993). **Biology** Saunders College Publishing, 3TH ed.
- SOREQ, H.; SEIDMAN, S. (2001). Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. **Nature Rev.** 2: 294-302.
- STÖCKLER, S.; HANEFELD, F.; FRAHM, J. (1996). Creatine replacement therapy in guanidinoacetate methyltransferase deficiency, a novel inborn error of metabolism. **Lancet** 348: 789-790.
- STÖCKLER, S.; HOLZBACH, U.; HANEFELD, F.; MARQUARDAT, I.; HELMS, G.; REQUART, M.; HÄNICKE, W.; FRAHM, J. (1994). Creatine deficiency in the brain: A new treatable inborn error of metabolism. **Pediatr. Res.** 36: 409-413.

- STÖCKLER, S.; MARESCAU, B.; DE DEYN, P.P.; TRIJBELS, J.M.; HANEFELD, F. (1997). Guanidino compounds in guanidinoacetate methyltransferase deficiency, a new inborn error of creatine synthesis. **Metabolism**, 46: 1189-1193.
- STRECK, E.L.; MATTE, C.; VIEIRA, P.S.; ROMBALDI, F.; WANNMACHER, C.M.D.; WAJNER, M.; WYSE, A.T.S. (2002a). Reduction of Na⁺,K⁺-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to chemically induced hyperhomocysteinemia. **Neurochem. Res.** 27: 1593-1598.
- STRECK, E.L.; ZUGNO, A.I.; TAGLIARI, B.; SARKIS, J.J.F.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D.; WYSE, A.T.S. (2002b). On the mechanism of the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity caused by homocysteine. **Int. J. Devl. Neurosc.** 20: 77-81.
- STRYER, L. (1996). **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 4^a ed.
- SWEADNER, K.J. (1979). Two molecular forms of (Na⁺+K⁺)-stimulated ATPase in brain. **J. Biol. Chem.** 254: 6060-6067.
- TALESA, V.N. (2001). Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. **Mech. Age Dev.** 122: 1961-1969.
- TAYLOR, P.; BROWN, J.H. (1994). Acetylcholine. In: SIEGEL, G.J.; ALBERS, R.W.; AGRANOFF, B.W. (eds). **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. P. 231-259.
- THERIEN, A.G.; GOLDSHELEGER, R.; KARLISH, S.J.; BLOSTEN, R. (1997). Tissue-specific distribution and modulatory role of the γ subunit in the Na⁺,K⁺-ATPase. **J. Biol. Chem.** 272: 32628-32634.
- TSAKIRIS, S.; ANGELOGIANNI, P.; SCHULPPIS, K.H.; STAVRIDIS, J.C. (2000). Protective effect of L-phenylalanine on rat brain

- acetylcholinesterase inhibition induced by free radicals. **Clin. Biochem.** 33: 103-106.
- VIANNI, P.; CERVATO, G.; FIORILLI, A.; CESTARO, B. (1991). Age-related differences in synaptosomal peroxidative damage and membrane properties. **J. Neurochem.** 56: 253-258.
- VINCENT, S.R.; HOPE, B.T. (1992). Neurons that say NO. **Trends Neurosci.** 15: 108-113.
- VON FIGURA, K.; HANEFELD, F.; ISBRANDT, D.; STÖCKLER-IPSIROGLU, S. (2001). Guanidinoacetate methyltransferase deficiency. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S., VALLE, D. (eds.), **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. New York: McGraw-Hill. 8th ed. 1897-1908.
- WEVERS, R.A.; ENGELKE, U.; WENDEL, U.; de JONG, J.G.; GABREËLS, F.J.; HEERSHARP, A. (1995). Standardized method for high resolution ¹H-NMR of cerebrospinal fluid. **Clin. Chem.** 41: 744-751.
- WYSE, A.T.S.; BRUSQUE, A.M.; SILVA, C.G.; STRECK, E.L.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D. (1998a). Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase from rat brain cortex by propionic acid. **Neuroreport** 9: 1719-1721.
- WYSE, A.T.S.; NORILER, M.E.; BORGES, L.F.; FLORIANO, P.J.; SILVA, C.G.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D. (1999). Alanine prevents the decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity in experimental phenylketonuria. **Metab. Brain Dis.** 14: 95-101.
- WYSE, A.T.S.; STEFANELLO, F.M.; CHIARANI, F.; DELWING, D.; WANNMACHER, C.M.D.; WAJNER, M. (2003). Arginine administration decreases cerebral cortex acetylcholinesterase and serum

butyrylcholinesterase probably by oxidative stress induction. **Neurochem.**

Res. In press.

WYSE, A.T.S.; STRECK, E.L.; BARROS, S.V.; BRUSQUE, A.M.; ZUGNO, A.I.;

WAJNER, M. (2000a). Methylmalonate administration decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in cerebral cortex of rats. **Neuroreport** 11: 2331-2334.

WYSE, A.T.S.; STRECK, E.L.; WORM, P.; WAJNER, A.; RITTER, F.; NETTO,

C.A. (2000b). Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity after brain ischemia. **Neurochem. Res.** 25: 971-975.

WYSE, A.T.S.; WAJNER, M.; BRUSQUE, A.M.; WANNMACHER, C.M.D.

(1995). Alanine reverses the inhibitory effect of phenylalanine and its metabolites on Na⁺,K⁺-ATPase in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of rats. **Biochem. Soc. Trans.** 23: 227S.

WYSE, A.T.S.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D. (1998b). Kinetics of

alanine reversal on the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity by phenylalanine and phenyllactate in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats. **Med. Sci. Res.** 26: 141-143.

YUFU, K.; ITHO, T.; EDAMATSU, R.; MORI, A.; HIRAKAWA, M. (1993). Effect

of hyperbaric oxygenation on the Na⁺,K⁺-ATPase and membrane fluidity of cerebrocortical membranes after experimental subarachnoid hemorrhage.

Neurochem. Res. 16: 1033-1039.