

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**EFEITO *IN VIVO* E *IN VITRO* DA PROLINA SOBRE A
ATIVIDADE DA Na^+ , K^+ -ATPase DE CÉREBRO DE RATOS**

ZILDA ELIZABETH DE ALBUQUERQUE SANTOS LOPES PONTES

ORIENTADORA

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

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

Porto Alegre, 2002

Dedico esta Dissertação ao meu
filho Bernardo, por ser meu grande
incentivo na busca de crescimento e
à minha orientadora Profa. Dra. Angela
Wyse por ter me ensinado e guiado no
caminho da pesquisa.

Quando iniciamos a vida, cada um de nós recebe um bloco de mármore e as ferramentas necessárias para convertê-lo em escultura. Podemos arrastá-lo intacto a vida toda, podemos reduzi-lo a cascalho ou podemos dar-lhe uma forma gloriosa.

Richard Bach

AGRADECIMENTOS

- À minha orientadora, Profa. Dra. Angela Wyse pela paciência, amizade, conhecimentos e "bons fluidos" ;
- Aos professores do laboratório de Erros Inatos do Metabolismo pelo conhecimento e amizade;
- Aos colegas de grupo e à Ana Brusque pela colaboração, parceria e amizade ;
- Aos bolsistas de Iniciação Científica Leandro Oliveira e Renata Franzon por todos os finais de semana, dias e noites de trabalho dividido;
- À minha família pelo apoio ;
- Aos meus tios Sandra e Antônio, pelo incentivo, amor e apoio incondicional ;
- À minha avó, pelo incentivo;
- À nutricionista Alice Pfaffenzeller pela flexibilização de horários, o que me permitiu fazer pesquisa;
- Às nutricionistas Sandra Muttoni e Márcia Perciúncula pelo apoio;
- Aos integrantes do Departamento de Bioquímica pela acolhida e conhecimentos transmitidos;
- Aos órgãos financiadores de pesquisa, que viabilizaram a realização deste trabalho.

RESUMO

A hiperprolinemia tipo II é um erro inato do metabolismo de aminoácido causado pela deficiência na atividade da Δ^1 pirrolino-5-carboxilato desidrogenase. O bloqueio dessa reação resulta no acúmulo tecidual de prolina. A doença caracteriza-se fundamentalmente por epilepsia, convulsões e um grau variável de retardo mental, cuja etiopatogenia ainda é desconhecida.

No tecido nervoso, a Na^+ , K^+ - ATPase controla o ambiente iônico relacionado com a atividade neuronal, regulando o volume celular, o fluxo de íons e o transporte de moléculas ligadas ao transporte de Na^+ , tais como, aminoácidos, neurotransmissores e glicose.

Evidências na literatura mostram que recém nascidos humanos com baixos níveis de Na^+ , K^+ -ATPase cerebral apresentam epilepsia e degeneração espongiiforme. Alterações na atividade desta enzima têm sido associadas a várias doenças que afetam o sistema nervoso central, como isquemia cerebral e doença de Parkinson.

Considerando que a inibição da Na^+ , K^+ - ATPase por ouabaína tem sido associada com liberação de neurotransmissores, incluindo glutamato, em uma variedade de preparações neuronais, e que alguns autores sugerem que o efeito da prolina sobre a sinapse glutamatérgica possa ser, pelo menos em parte, responsável pelos sintomas neurológicos encontrados nos pacientes com hiperprolinemia, no presente trabalho verificamos efeitos dos modelos experimentais agudo e crônico de hiperprolinemia tipo II sobre a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase de membrana plasmática sináptica de córtex cerebral e hipocampo de ratos.

No modelo crônico, a prolina foi administrada a ratos Wistar duas vezes ao dia do 6º ao 28º dia de vida, enquanto que no modelo agudo os animais, com 15 dias de vida, receberam uma única injeção de prolina e foram sacrificados 1 hora após a administração da droga.

Os animais tratados cronicamente com prolina não apresentaram alterações significativas no peso corporal, do encéfalo, do hipocampo e do córtex cerebral, bem como nas quantidades de proteínas do homogenizado cerebral e da membrana plasmática sináptica de córtex cerebral e hipocampo.

Nossos resultados mostraram uma diminuição significativa na atividade da Na^+ , K^+ - ATPase de membrana plasmática sináptica de cérebro de animais tratados aguda e cronicamente com prolina.

Foram também testados os efeitos *in vitro* da prolina e do glutamato sobre a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase. Os resultados mostraram que os dois aminoácidos, nas concentrações de 1,0 e 2,0 mM, inibiram significativamente a atividade da enzima.

O estudo da interação cinética entre prolina e glutamato, sugere a existência de um sítio único de ligação na Na^+ , K^+ - ATPase para os dois aminoácidos.

É possível que a inibição na atividade da Na^+ , K^+ - ATPase possa estar envolvida nos mecanismos pelos quais a prolina é neurotóxica. Acreditamos que nossos resultados possam contribuir, pelo menos em parte, na compreensão da disfunção neurológica encontrada em pacientes com hiperprolinemia tipo II.

ABSTRACT

Type II hiperprolinemia (HP) is a disorder of amino acid metabolism caused by a severe deficiency of Δ^1 pyrroline-5-carboxylic acid dehydrogenase activity and results mainly in tissue accumulation of proline. Most patients detected so far show neurological manifestations including seizures and mental retardation. The mechanisms by which this occurs are poorly understood.

Na^+ , K^+ -ATPase is a crucial enzyme responsible for the active transport of sodium and potassium ions in the central nervous system (CNS) which is necessary to maintain the ionic gradient for neuronal excitability. It is found at high concentrations in the brain cellular membrane, consuming about 40-50% of the ATP generated in this tissue. It is known that inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase activity by ouabain induces the release of the excitatory neurotransmitter glutamate, which is thought to play a major role in neuronal death.

In this study Na^+ , K^+ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase activities were determined in the synaptic plasma membranes from brain of rats subjected to acute or chronic proline administration. Na^+ , K^+ -ATPase activity was significantly reduced. Mg^{2+} -ATPase activity was not altered by any treatment. In another set of experiments, synaptic plasma membranes were prepared from brain of rats and incubated with proline or glutamate at final concentrations ranging from 0.2 to 2.0 mM. Na^+ , K^+ -ATPase activity, but not Mg^{2+} -ATPase activity, was inhibited.

Kinetic studies performed on the inhibitory interaction between proline and glutamate on Na^+ , K^+ -ATPase activity shows that a competition between proline and glutamate for the same binding site of the enzyme probably occurs.

Since proline concentrations in plasma of chronically treated rats and of type II hyperprolinemic children are of the same order of magnitude as those tested *in vitro*, the results suggest that reductions of Na⁺, K⁺-ATPase activity may contribute to the neurological dysfunction found in some patients affected by type II hyperprolinemia.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	01
1.1- Erros Inatos do Metabolismo.....	01
1.2- Prolina.....	05
1.3- Hiperprolinemias.....	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.....	11
1.3.2.3. - Manifestações Clínicas.....	12
1.3.2.4. - Tratamento.....	14
1.4 - Modelo Animal de Hiperprolinemia tipo II.....	16
1.5- Na ⁺ , K ⁺ -ATPase.....	18
1.5.1- Conceito, Função e Estrutura.....	18
1.5.2- Mecanismo de Reação.....	25
1.5.3 - Na ⁺ , K ⁺ -ATPase e Disfunção Cerebral.....	28
1.6- Objetivos.....	30
2.0- ARTIGOS.....	31
3.0- DISCUSSÃO.....	34
4.0- CONCLUSÃO.....	44

5.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
6.0- ANEXOS.....	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. - Classificação dos erros inatos do metabolismo de acordo com a área do metabolismo envolvida.

TABELA 2 . Transportadores P-tipo ATPase.

TABELA 3. - Doses de prolina administradas, nos tratamentos crônico e agudo, de acordo com a idade dos ratos.

TABELA 4 - Peso corporal, do encéfalo, cerebelo e córtex de ratos tratados do 6º ao 28º dia de vida e sacrificados 12 h após o término do tratamento (Artigo I).

TABELA 4.1 - Concentração de proteínas em córtex cerebral de ratos tratados do 6º ao 28º dia de vida e sacrificados 12 h após o término do tratamento (Artigo I).

TABELA 5 - Peso corporal, do encéfalo, cerebelo, córtex e hipocampo de ratos tratados do 6^o ao 28^o dia de vida e sacrificados 12 h após o término do tratamento (Artigo II).

TABELA 5.1 - Concentração de proteínas em hipocampo cerebral de ratos tratados do 6^o ao 28^o dia de vida e sacrificados 12 h após o término do tratamento (Artigo II).

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura geral dos aminoácidos, encontrados nas proteínas.

FIGURA 2. Estrutura da prolina.

FIGURA 3. Rotas metabólicas da biossíntese e da degradação da prolina.

FIGUEA 4. Degradação e síntese da prolina.

FIGURA 5. Na⁺, K⁺ -ATPase. Formação do potencial elétrico transmembrana.

FIGURA 6. Estrutura da Na⁺, K⁺ - ATPase.

FIGURA 7. Mecanismo de ação da Na⁺, K⁺ - ATPase.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Erros inatos do metabolismo

O conceito de distúrbios bioquímicos humanos, denominados erros inatos do metabolismo, foi proposto por Sir Archibald Garrot em 1908. Os erros inatos do metabolismo são alterações genéticas que se manifestam pela diminuição da função, ou mesmo ausência de uma proteína, geralmente uma enzima. Estas alterações resultam em bloqueio de rotas metabólicas. Como consequência, podem ocorrer tanto o acúmulo de metabólitos tóxicos como a falta de produtos essenciais, ambos com doença subsequente (Bickel, 1987).

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

Foram descritos até o momento mais de 500 erros inatos do metabolismo (Scriver, 2001) a maioria deles envolvendo processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Benson & Fensom, 1985), causando um grande número de defeitos, com quadros clínicos diversos, que podem ser desde assintomáticos até tão graves que causem morte neonatal. Os erros inatos do metabolismo são situações graves, que geralmente se manifestam na infância, apresentando-se com sinais e

sintomas semelhantes aos encontrados em muitas doenças infantis (Holtzman, 1978).

Embora individualmente sejam considerados raros, os EIM são relativamente freqüentes em seu conjunto, podendo ocorrer 1 em cada 1000 recém-nascidos vivos (Giugliani, 1988).

O tratamento dos erros inatos do metabolismo é mais bem sucedido quanto mais precoce for seu diagnóstico e pode ser abordado de diferentes formas:

- Limitando a entrada do precursor (como exemplo na fenilcetonúria, onde se deve evitar a ingestão de fenilalanina);
- Suplementando o metabólito ausente (como exemplo no hipotireoidismo, administrando-se tiroxina);
- Inibindo a formação da substância acumulada (como no caso da gota onde se administra alopurinol para inibir a xantina oxidase);
- Inibindo o acúmulo de determinada substância (como na Doença de Wilson, onde com o uso de drogas se impede o depósito de cobre);
- Controlando fatores desencadeantes (onde se evitam certas substâncias, principalmente fármacos);
- Aumentando a atividade enzimática (como na homocistinúria, onde se aumentam as doses do cofator, a piridoxina);

- Suplementando a proteína não enzimática deficiente (como na hemofilia, onde se administra o fator VIII);
- Suplementando a enzima deficiente .

As técnicas de investigação bioquímica tem aumentado a descoberta de novos erros inatos do metabolismo e ajudado a esclarecer ainda mais os já conhecidos.

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DOS ERROS INATOS DO METABOLISMO DE ACORDO COM AS ÁREAS DO METABOLISMO ENVOLVIDA.

EIM dos aminoácidos

EIM dos ácidos orgânicos

EIM dos glicídios

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

EIM das proteínas plasmáticas

1.2. Prolina

Os aminoácidos são conhecidos como α -aminoácidos porque possuem em sua estrutura química um grupo amino primário ($-\text{NH}_2$) e um grupo carboxílico ($-\text{COOH}$) ligados a um mesmo átomo de carbono (o carbono α). Os aminoácidos diferem uns dos outros através de suas cadeias laterais, que variam em estrutura, tamanho e carga elétrica (Lenhinger, 2000).

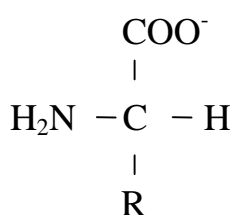


Figura 1. Estrutura geral dos aminoácidos encontrados nas proteínas.

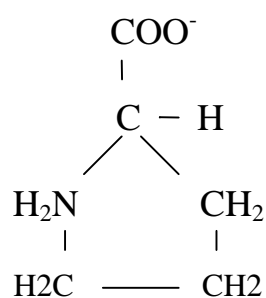


Figura 2. Estrutura da prolina

A análise de um grande número de proteínas demonstrou que elas são formadas por 20 aminoácidos-padrão (Voet, 1999).

A L-prolina é um aminoácido não essencial em crianças e adultos e condicionalmente essencial em prematuros. Em sua estrutura química, a L-prolina possui um grupo amino secundário ($-\text{NH}$), que forma uma base de

Schiff (imino), reação bioquímica importante entre uma amina e um aldeído, o que lhe confere a denominação de iminoácido (Voet, 1999).

Em sua rota metabólica a prolina pode ser sintetizada a partir de glutamato e ornitina, podendo também ser degradada a glutamato tendo glutamato- γ -semialdeído e pirrolino-5-carboxilato (P5C) como intermediários comuns (Voet, 1999). Glutamato- γ -semialdeído participa tanto da biossíntese, quanto da degradação da prolina, formando uma base de Schiff interna com P5C, catalisada por Δ^1 pirrolino-5-carboxilato redutase, na biossíntese e Δ^1 pirrolino-5-carboxilato desidrogenase, na degradação (Lehninger, 2000).

Cabe ressaltar que a transformação de P5C em glutamato- γ -semialdeído é espontânea, reversível e diretamente relacionada com a necessidade funcional da célula. A regulação do metabolismo da prolina é complexa devido à presença de intermediários comuns entre a biossíntese e o catabolismo (Figura 3).

A enzima P5C sintase, que catalisa a produção de P5C a partir do glutamato é ATP e NADPH dependente, tendo alta atividade na mucosa do intestino delgado, 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 encontrado em todos os tecidos (Phang, 2001).

As rotas da prolina, que envolvem a interconversão entre glutamato, ornitina e prolina, têm como funções metabólicas, formar prolina para a síntese protéica, para a gliconeogênese hepática e para a síntese de ornitina (pela ação da ornitina- δ -aminotransferase) e de arginina (ciclo da uréia), tendo P5C como intermediário (Phang, 2001).

A pirrolina-5-carboxilato (P5C) não é somente um intermediário no metabolismo da prolina é também um constituinte do plasma humano. Seus níveis flutuam ao longo do dia, tendo picos associados com as refeições (Phang, 2001).

A concentração normal de prolina no plasma humano é de 100 a 450 μM , sendo estes valores menores em crianças. No líquido os valores são ainda mais baixos (1 a 4 μM). Iminoglicinúria neonatal e prolinúria pós-natal são achados normais e ocorrem devido a imaturidade do sistema de reabsorção tubular de prolina (Phang, 2001).

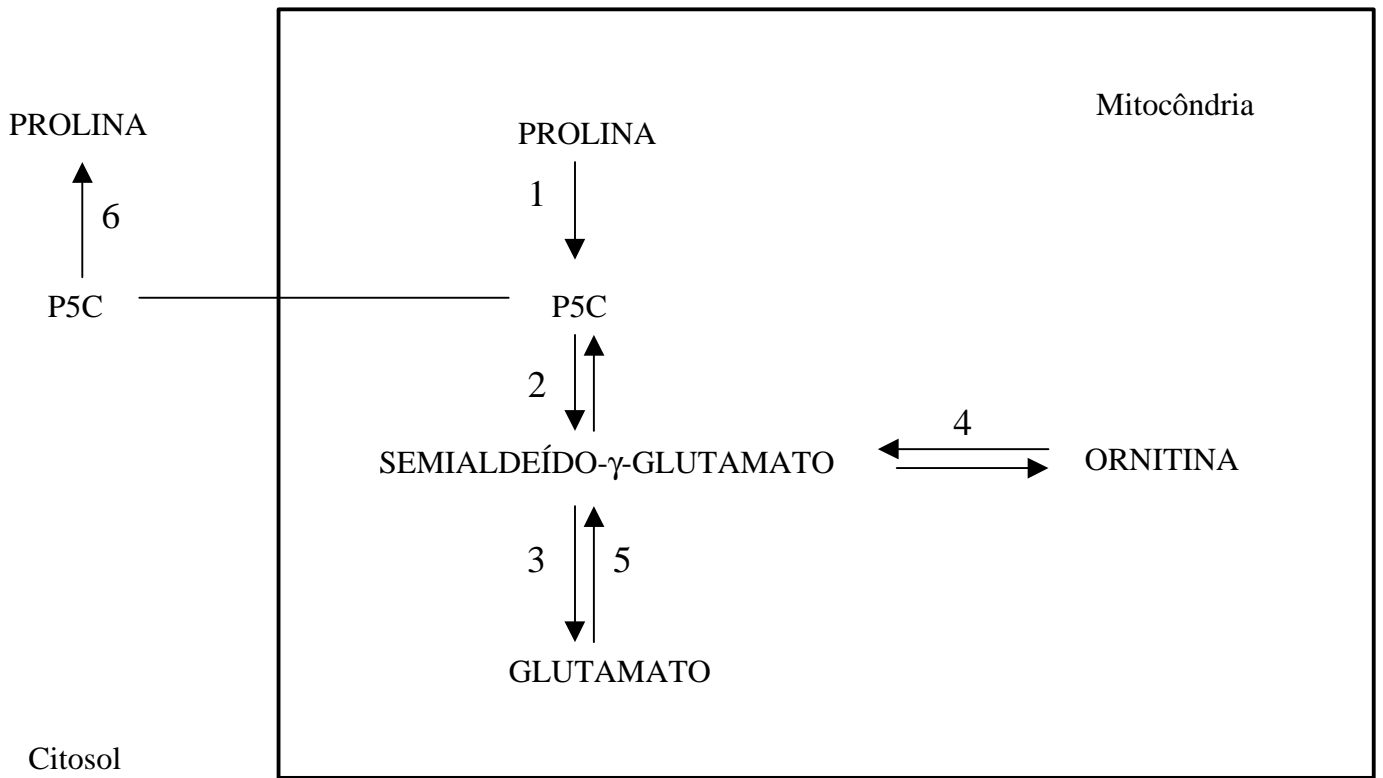
Interessantemente, a L-prolina se enquadra em vários critérios clássicos utilizados para definir um neurotransmissor no sistema nervoso central de mamíferos, tais como:

- biossíntese em sinaptossomas,

- acúmulo em sinaptossomas por mecanismo de transporte Na^+ -dependente de alta afinidades após despolarização induzida por K^+ (Cohen, 1997)
- distribuição regional no cérebro, com plasticidade em certas rotas glutamatérgicas (Phang, 2001).

Dados da literatura mostram que os RNAm que codificam PROT (transportadores de L-prolina) 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 sistema nervoso central (Fremeau, 1992; Velaz-Faircloth, 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, 1997).

Outros autores mostram 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).



1. Prolina Oxidase
2. Reação não enzimática
3. Δ^1 pirrolino-5-carboxilase desidrogenase
4. Ornitina-aminotransferase
5. P5C sintase
6. P5C redutase

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

1.3. Hiperprolinemias

1.3.1. Conceito e Classificação

Hiperprolinemias são erros inatos do metabolismo da prolina, causados pela deficiência de enzimas envolvidas na sua rota de degradação, levando ao acúmulo tecidual deste aminoácido. As hiperprolinemias podem ser classificadas em hiperprolinemias tipo I e tipo II.

A hiperprolinemia tipo I é causada pela deficiência de prolina oxidase, enzima responsável pelo primeiro passo na rota de degradação da prolina. Não existem evidências entre a deficiência de prolina oxidase e manifestações clínicas. O diagnóstico é feito por exclusão, ou seja, os casos de hiperprolinemia não devidos a deficiência da enzima P5C desidrogenase são considerados hiperprolinemia tipo I. Não há demonstração direta da deficiência da prolina oxidase, já que esta enzima não apresenta atividade em leucócitos ou em cultura de fibroblastos (Phang, 2001).

A hiperprolinemia tipo II é causada pela deficiência de Δ^1 pirrolino-5-carboxilato desidrogenase, enzima responsável pelo segundo passo da rota de degradação de prolina. Embora seja considerada uma doença benigna, há uma associação causal com manifestações neurológicas na infância (Phang, 2001).

Por sua associação com manifestações neurológicas o presente trabalho focou sua investigação na hiperprolinemia tipo II.

1.3.2. Hiperprolinemia tipo II

1.3.2.1. *Conceito*

É um erro inato do metabolismo da prolina, de característica autossômica recessiva, onde há diminuição da atividade da enzima Δ^1 pirrolino-5-carboxilato desidrogenase (P5CDh), enzima que catalisa a transformação de pirrolino-5-carboxilato (P5C) em glutamato (Figura 4) (Phang, 2001).

1.3.2.2. *Diagnóstico*

O diagnóstico da doença é baseado em níveis aumentados de prolina sérica, em torno de 2000 μM , ou seja, 10 a 15 vezes dos valores normais (100 - 450 μM) e níveis aumentados de P5C plasmático e urinário de 10 a 40 vezes dos valores normais (Phang, 2001).

Os níveis de prolina e glutamato estão aumentados no líquido (Van Herreveld e Fifkova, 1973; Rohads, 1983; Phang, 2001) e pode haver

presença de iminoglicinúria, devido a competição da prolina com outros aminoácidos que compartilham um sistema comum de transporte renal, e ainda há excreção aumentada de P5C na urina (Applegarth, 1974; Goodman, 1974).

Para o diagnóstico, o P5C pode ser qualitativamente identificado na urina por sua reação com aminobenzaldeído e TCA, em álcool, que produz uma cor amarela (Strecker, 1975; Efron, 1965; Strecker, 1960 - citados por Phang, 2001). Quantitativamente, as concentrações de P5C no plasma e na urina podem ser obtidas por testes específicos (Mixson, 1991; Fleming, 1984).

A atividade da enzima P5C desidrogenase pode ser determinada em cultura de fibroblastos ou de leucócitos (Phang, 2001).

1.3.2.3. Manifestações Clínicas

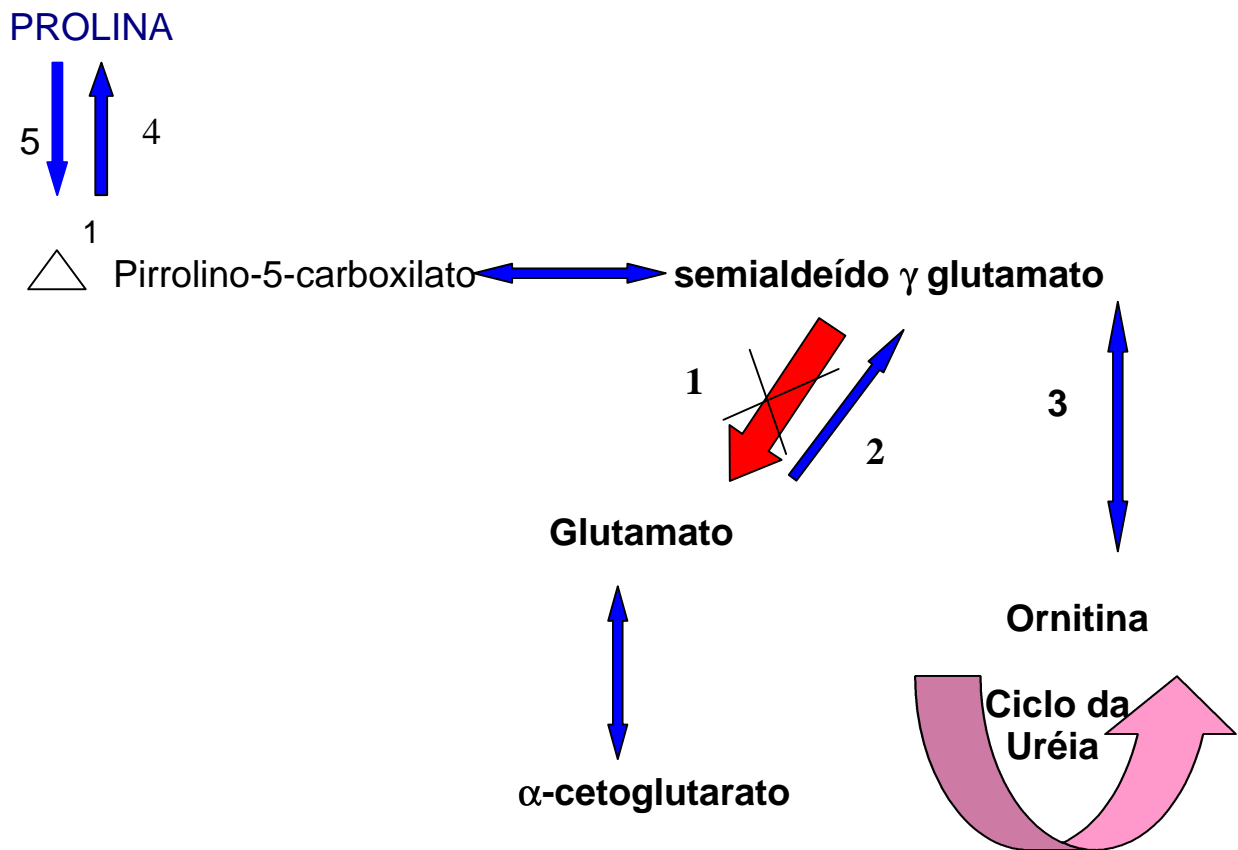
Ainda não está estabelecido se hiperprolinemia tipo II é uma doença benigna ou se afeta o sistema nervoso central (Phang, 2001). Embora muitos pacientes hiperprolinêmicos apresentem alterações neurológicas, como epilepsia e retardo mental, outros são clinicamente normais. Para Flynn e colaboradores (1989), esses achados indicam que a manutenção de concentrações plasmáticas elevadas de prolina não são suficientes para causar dano neurológico, porém, podem predispor a convulsões. Outros

pesquisadores observaram que a administração intracerebral ou subcutânea de prolina em ratos altera a formação de memória e aprendizado (Cherkin, 1976; Moreira, 1989), o que poderia refletir nos efeitos neurotóxicos da prolina e as conseqüentes alterações fisiopatológicas que ocorrem no cérebro destes animais (Oton e Markowska, 1994).

O papel da prolina sobre a função do sistema nervoso central é incerto. Porém, manifestações neurológicas encontradas em pacientes hiperprolinêmicos sintomáticos, aliadas ao aparente papel que elevados níveis de prolina exerce no sistema nervoso central, ativando receptores glutamatérgicos (Ault, 1987; Henzi, 1992; Martin 1992; Pace, 1992; Nistri e Morelli, 1978), apresentando transportadores próprios expressos em neurônios glutamatérgicos (Fremeau, 1992; Fremeau, 1996; Shafqat, 1995; Velaz-Faircloth, 1995; Fremeau, 1992; Nadler, 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), as hiperprolinemias são condições consideradas benignas, não causando doença. Exceto com algumas manifestações clínicas, que ocorrem na infância, a vida adulta é assintomática. Por outro lado, Benson e Fenson (1985) acreditam que há variantes nas hiperprolinemias, defendendo a idéia de tentar reduzir os níveis de prolina precocemente nos indivíduos afetados. No entanto, a prolina é um aminoácido não essencial, sintetizado através de outros aminoácidos; a maioria das proteínas contém resíduos de prolina, o que torna a restrição dietética deste aminoácido muito difícil, levando a apenas um modesto controle nos valores plasmáticos, não causando impacto nas manifestações clínicas da doença (Phang, 2001).



1. \triangle^1 Pirrolino-5-carboxilato desidrogenase
2. \triangle^1 Pirrolino-5-carboxilato sintase
3. Ornitina amino transferase
4. \triangle^1 Pirrolino-5-carboxilato redutase
5. Prolina oxidase

Figura 4 – Degradação e síntese da prolina. Destaque para o local de bloqueio da rota na hiperprolinemia tipo II.

1.4 Modelo animal de hiperprolinemia tipo II

Os modelos animais de erros inatos do metabolismo 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 paracem ser os erros inatos do metabolismo 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 administrados por via subcutânea, varias doses de prolina variando de acordo com o peso e a idade dos ratos. Os animais controles receberam igual volume de solução salina 0,9% (1ml / 100g de peso

corporal). As soluções foram administradas 2 vezes aos 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).

A prolina apresenta inúmeras propriedades como neurotransmissor, sugerindo um papel importante na transmissão sináptica. Evidências mostram que altas concentrações de prolina ($>100 \mu\text{M}$) ativa receptores NMDA (Ault, 1987; Henzi, 1992; Martin, 1992; Pace, 1992), AMPA (Henzi,1992) e stricnina-sensível-glicina (Henzi, 1992; Nistri e Morelli, 1978) em cérebro de ratos.

A administração intracerebral de prolina, em galinhas, interfere na formação de memória e aprendizado (Cherkin, 1976; Van Harreveld, 1974). Por outro lado, a prolina quando administrada em ratos apresenta ação tanto excitatória quanto inibitória no sistema nervoso central (Zarzecki, 1975; Felix e Künzle, 1974; Segal, 1976; Nistri e Morelli, 1976; Vyklický, 1982; Ault, 1987; Henzi e MacDermott, 1991 - citados por Martin, 1992).

Estudos eletrofisiológicos sugerem que prolina atua de forma excitatória no hipocampo (Ault e Nadler, 1984). Dados mostram que este aminoácido despolariza células piramidais da região CA1 atuando diretamente sobre o soma e dendritos destes neurônios (Martin, 1992).

A habilidade da prolina em despolarizar neurônios hipocampais, por

ativação de receptores glutamatérgicos suporta a idéia de que a prolina possa causar dano em neurônios do sistema nervoso central, através de mecanismo excitotóxico (Nadler, 1985), o que pode estar associado a convulsões e retardo mental presente na hiperprolinemia tipo II.

1.4. Na^+ , K^+ - ATPase (ATP fosfoidrolase, EC 3.6.1.3)

1.4.1. Conceito, Função e Estrutura

A idéia da existência de uma bomba de sódio na membrana celular foi introduzida por Dean em 1941, baseando-se em experimentos realizados já na década de 30 por Heppel, Heppel e Schmidt e Steinbach (Dean, 1941) .

O conceito do transporte de sódio e da bomba de sódio foi desenvolvido nos anos seguintes, sendo convincentemente demonstrado por experimentos de Ussing e Zerahn (Ussing, 1988).

Em 1954 Skou sugeriu que a bomba capaz de realizar o transporte ativo de Na^+ e K^+ contra seus gradientes de concentração era de natureza protéica e estava ligada a membrana plasmática (Skou, 1992). Em 1997, **Jean C. Skou** recebeu o Prêmio Nobel de Química por sua descoberta.

A Na^+ , K^+ - ATPase é uma proteína integral de membrana, cuja característica é a forte ligação com a membrana lipídica, que requer agentes (detergentes, solventes orgânicos ou desnaturantes), para sua solubilização. É

formada por 2 subunidades, que translocam Na^+ e K^+ contra seus gradientes de concentração, através da membrana plasmática, processo chamado de transporte ativo, utilizando a energia da hidrólise do ATP em ADP. Todas as células produzem e consomem ATP para a manutenção das concentrações citosólicas de Na^+ e K^+ , sendo que nas células neuronais este consumo é de 40 a 60% (Whittan, 1962).

Para estabelecer e manter altas concentrações de Na^+ extracelular e K^+ intracelular a enzima Na^+ , K^+ - ATPase transloca três cargas positivas para o meio extracelular e duas negativas para o meio intracelular, formando um gradiente eletroquímico através da membrana celular (Lingrel, 1994), utilizando a hidrólise do ATP como energia. Este gradiente é necessário para manter o potencial de membrana, para a manutenção e regulação do volume celular e para o transporte de substâncias Na^+ dependentes, tais como, glicose, aminoácidos, neurotransmissores e outros íons (Gerring, 1990).

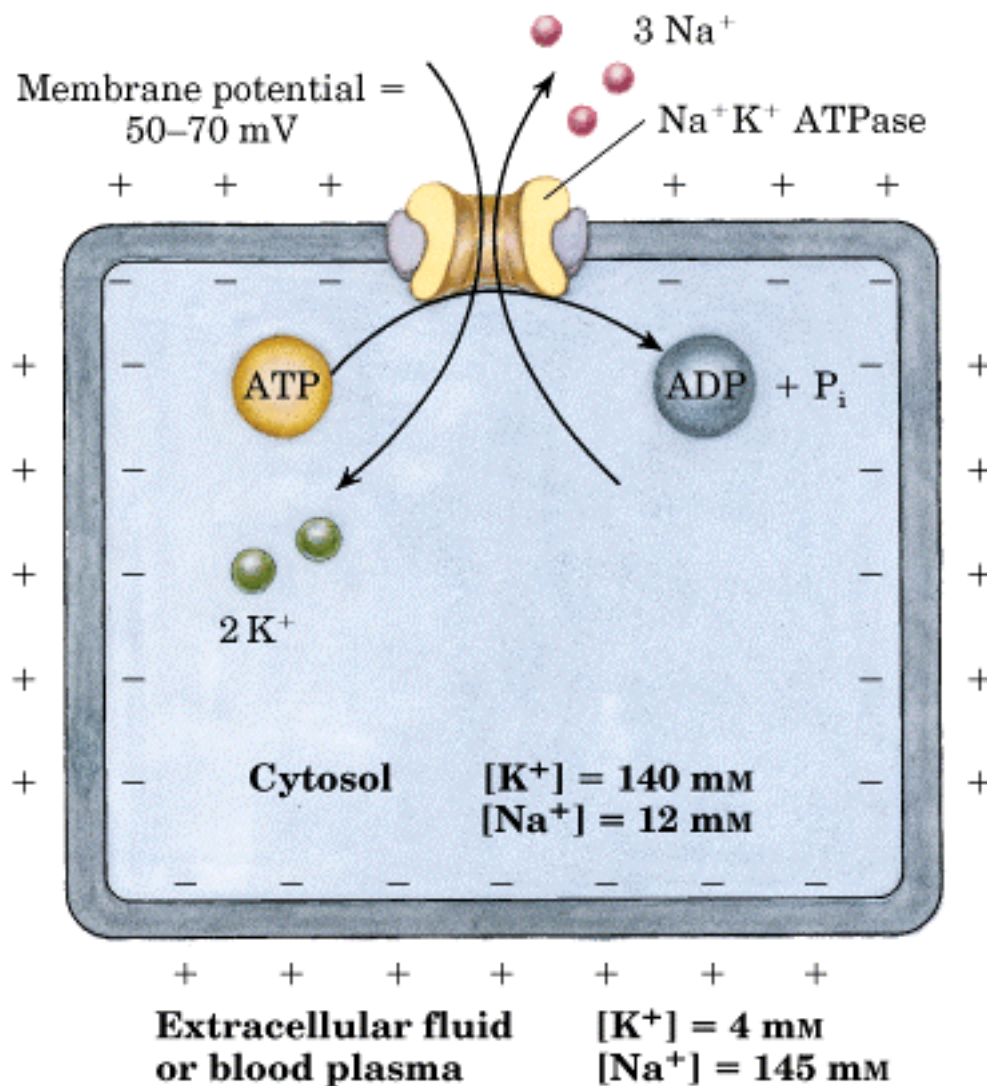


FIGURA 5. Na⁺, K⁺ - ATPase . Formação do potencial elétrico transmembrana. Adaptado de Lehninger 2000.

A Na⁺, K⁺ - ATPase é um tetrâmero constituído de duas subunidades diferentes (α e β), as quais estão associadas não covalentemente (Jorgensen, 1982; Renaud, 1991). Estas subunidades estão incorporadas na bicamada lipídica da membrana plasmática (Horowitz, 1990).

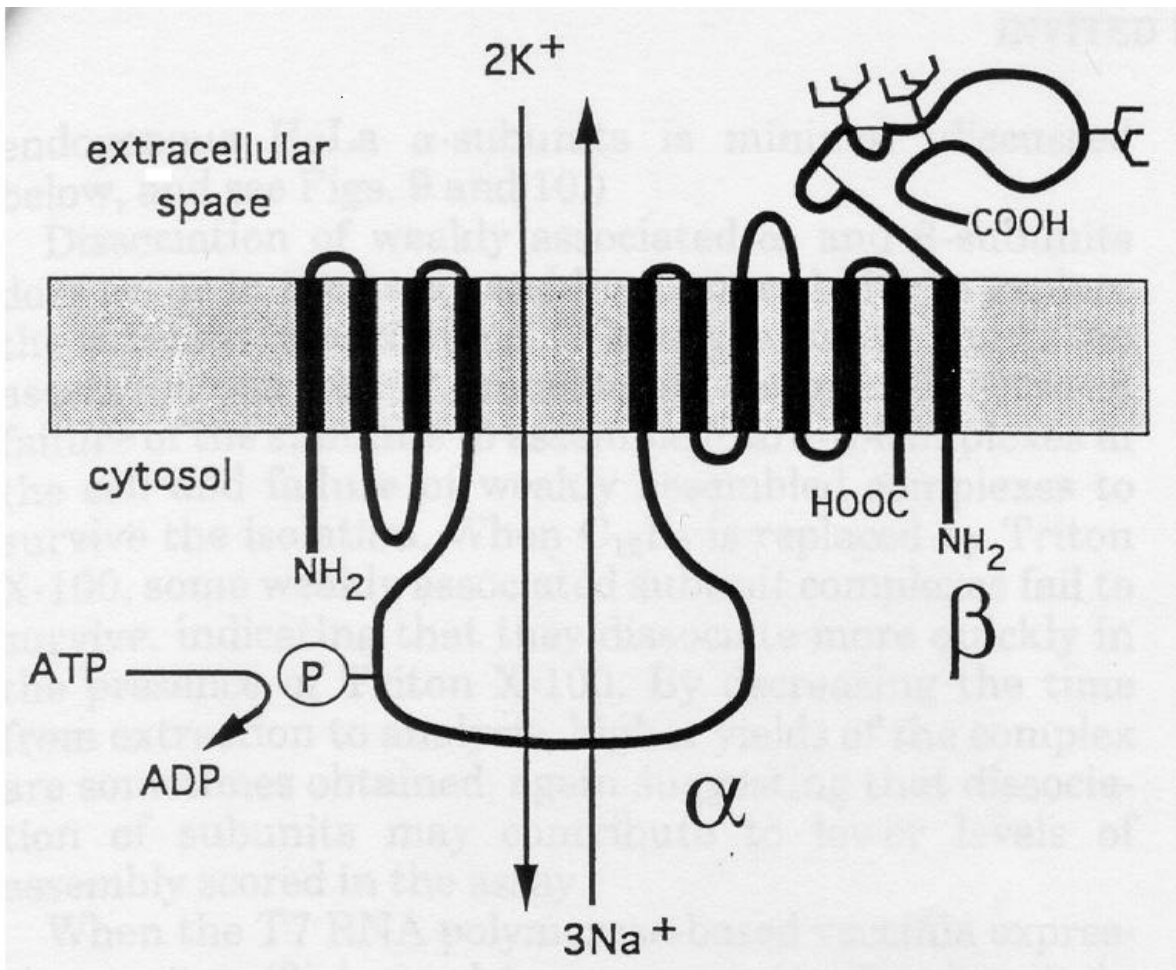


FIGURA 6 - Estrutura da Na^+ , K^+ - ATPase. Adaptado de Fambrough et al., 1994.

A subunidade α é formada por 1012 aminoácidos, tem um peso molecular de aproximadamente 100 Kd e 7-8 domínios hidrofóbicos transmembrânicos em α hélice e uma grande porção intracelular em β pregueada (Renaud, 1991). A subunidade α é catalítica, porque possui os sítios de ligação para ATP, Mg^{2+} , Na^+ , K^+ e ouabaina. Esta subunidade contém ligantes necessários para a fosforilação da enzima (ATP e íons sódio)

localizados na superfície citoplasmática, e os ligantes para os íons potássio, necessários para a desfosforilação da enzima e inibidores clássicos, como a ouabaína, localizados na superfície celular (Schull, 1985).

Já foram identificadas 4 isoformas da subunidade catalítica, denominadas α_1 , encontrada em todas as células e predominante no rim, α_2 predominante no músculo esquelético, neurônios e células gliais, α_3 encontrada em neurônios e músculo cardíaco (Lingrel & Kuntzweiler, 1994) e recentemente foi descoberta a subunidade α_4 , encontrada no espermatozóide (Blanco & Mercer, 1998; Woo et al., 2000).

A subunidade β contém aproximadamente 300 aminoácidos, tem um peso molecular de 60 Kd e contém um simples domínio hidrofóbico transmembrânico (Renaud, 1991). Não existem sítios catalíticos na subunidade β e também não é possível separá-la da subunidade α sem a perda da atividade enzimática (Skou & Esmann, 1992). Sua função não está bem definida, mas estudos demonstram que a subunidade β parece ter um importante papel na maturação (Geering, 1990) e inserção da subunidade α na membrana (Hiatt, 1984). Já foram identificadas 2 isoformas da subunidade β no tecido humano. A isoforma β_1 é predominante no rim e a β_2 no tecido cerebral.

A Na^+ , K^+ - ATPase é formada pela combinação das subunidades α e β , e sua distribuição depende da espécie, tecido, tipo celular e estágio de desenvolvimento (Glynn, 1993).

A Na^+ , K^+ - ATPase pertence a uma classe de transportadores, reversivelmente fosforilados que recebem a denominação de P-tipo ATPase, amplamente distribuídos (Lehninger, 2000), conforme TABELA 2.

Ions transportados	Organismo	Tipode membrana	Papel da ATPase
Na^+K^+	Eucariotos	Plasmática	Manter baixa $[\text{Na}^+]$ e alta $[\text{K}^+]$ dentro da célula; criar potencial elétrico transmembrana
H^+K^+	Células ácido secretoras, de mamíferos	Plasmática	Acidificar conteúdo estomacal
H^+	Fungo (<i>Neurospora</i>) Plantas superiores	Plasmática	Manter pH baixo no compartimento celular, ativando proteases e outras enzimas hidrolíticas
Ca^{2+}	Eucariotos	Plasmática	Manter baixa $[\text{Ca}^{2+}]$ no citosol
Ca^{2+}	Células musculares animais	Reticulo sarcoplasmático	Sequestrar Ca^{2+} intracelular, mantendo baixo $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular

TABELA 2 . Transportadores P-tipo ATPase. Adaptado de Lehninger, 2000.

1.4.2. Mecanismos de reação:

Em condições normais de funcionamento, a Na^+ , K^+ - ATPase bombeia 3 íons sódio para o meio extracelular e 2 íons potássio para o meio intracelular para cada molécula de ATP hidrolisada (Glynn, 1993). A enzima utiliza ATP e água e produz como resultado ADP e fosfato inorgânico, além de realizar o transporte de dois cátions diferentes em sentidos opostos. O mecanismo de reação sugere seis etapas fundamentais envolvendo dois estados conformacionais principais, dependentes de fosforilação. Estado conformacional II, forma fosforilada, com alta afinidade por K^+ e baixa afinidade por Na^+ e estado conformacional I, forma desfosforilada, com alta afinidade por Na^+ e baixa afinidade por K^+ . O mecanismo de ação pode ser esquematizado conforme a FIGURA 7, onde: (1) há ligação de 3 íons Na^+ em um sítio de alta afinidade para Na^+ , na porção intracelular da enzima; (2) onde também existe um sítio de ligação para o ATP, neste momento há fosforilação da enzima e mudança conformacional que promove o transporte; a enzima só pode ser fosforilada pelo ATP na presença de íons sódio na face intracelular da molécula da enzima (Blostein, 1979; Blostein et al., 1979). A fosforilação facilita a oclusão dos três íons sódio na molécula da enzima; (3) diminui a alta afinidade para o Na^+ levando este íon a ser liberado na porção externa da célula; há mudança do estado conformacional I para II (Lingrel &

Kuntzweiler, 1994); **(4)** o K^+ se liga em um sítio de alta afinidade da enzima, na porção extracelular, esta ligação transfere o grupo fosfato liberado no primeiro passo para a água (formando o fosfato inorgânico); **(5)** a enzima é desfosforilada, reduzindo a afinidade pelo íon K^+ (Glynn, 1993); **(6)** o K^+ é liberado na porção intracelular, acompanhado de mudança do estado conformacional II para I. O ciclo recomeça.

As mudanças na conformação da enzima alteram a reatividade da bomba e mudam a seletividade dos sítios; esta mudança é dependente de íons sódio e potássio, sendo os íons sódio importantes para a fosforilação e os íons potássio para a desfosforilação (Charnock & Post, 1963; Alberts, 1963; Post, 1965; Glynn, 1993). O ATP, durante o ciclo, exerce duas funções distintas: liga-se aos sítios de alta afinidade, fosforilando a enzima e, liga-se aos sítios de baixa afinidade, sem fosforilar, atuando como modulador alostérico positivo, acelerando a conformação, facilitando a liberação dos íons potássio para o meio intracelular (Glynn, 1993).

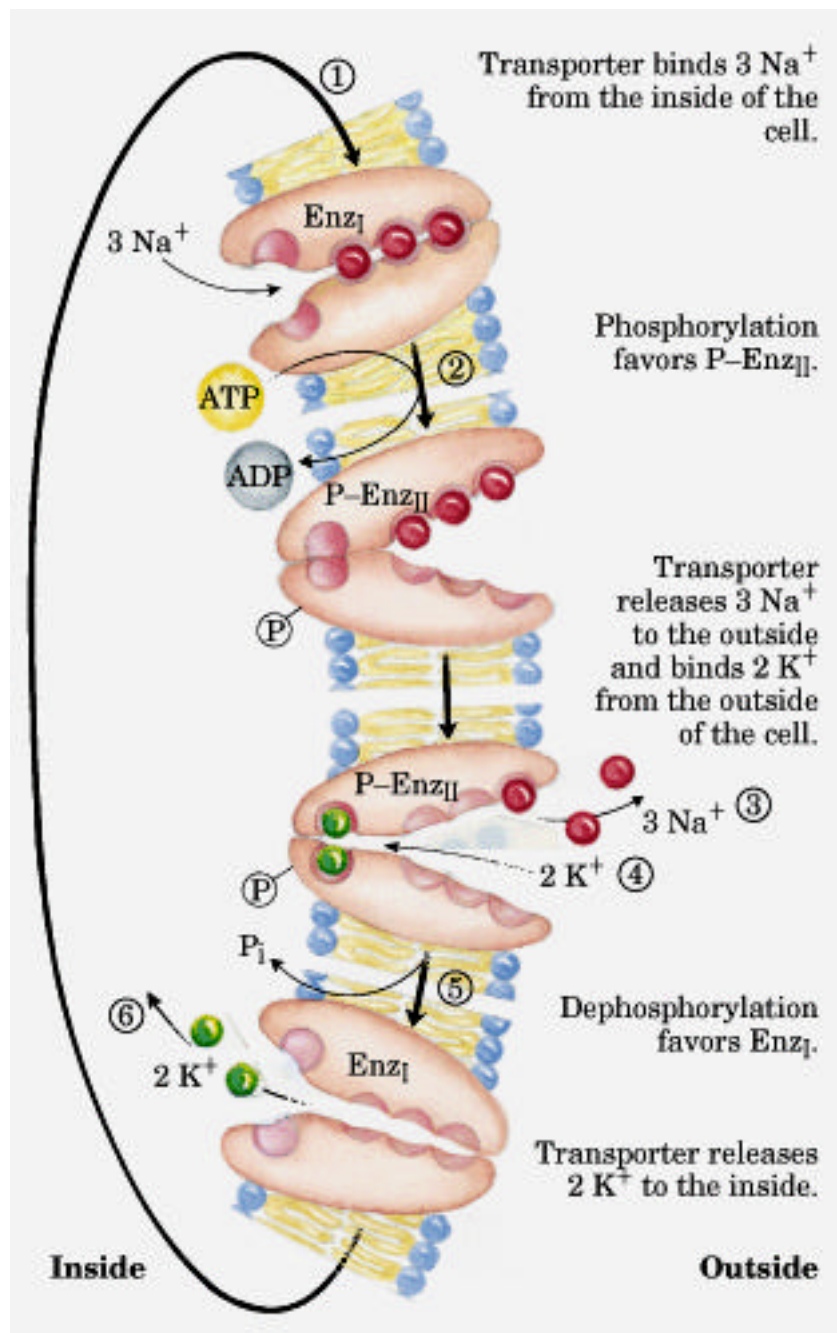


FIGURA 7. Mecanismo de ação da enzima Na⁺, K⁺ - ATPase. Adaptado de Lehninger, 2000.

A ouabaína, um inibidor específico da Na^+ , K^+ -ATPase, liga-se a subunidade α fosforilada impedindo a etapa de desfosforilação (Lingrel & Kuntzweiler, 1994; Voet & Voet, 1999).

1.4.3. Na^+ , K^+ -ATPase e disfunção cerebral:

A Na^+ , K^+ -ATPase tem um papel fundamental na manutenção e na restauração do gradiente elétrico da membrana celular neuronal, necessário para a propagação do impulso nervoso (Siegel, 1981)

A inibição da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase tem sido associada a diversas neuropatologias, tais como epilepsia e isquemia cerebral (Grisar, 1984; Wyse, 2000). Neste contexto, Hanglund e colaboradores (1985) demonstraram uma redução na atividade da enzima em regiões cerebrais, sugerindo que esta diminuição pode estar relacionada a anormalidades encontradas em crises convulsivas. Em concordância com estes dados, Rapport e colaboradores (1975) encontraram uma diminuição de 60% na atividade da Na^+ , K^+ -ATPase em córtex cerebral de pacientes que apresentavam convulsões generalizadas.

A inibição da enzima está associada à liberação de neurotransmissores em uma variedade de preparações neuronais (Jacobson, 1986).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que alguns aminoácidos inibem a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase. Wyse e colaboradores (1995) demonstraram que a fenilalanina e seus metabólitos (fenilpiruvato, fenilacetato e fenilactato) inibem *in vitro* a atividade da enzima em torno de 20%. Bürger (1998) demonstrou semelhante comportamento para leucina, valina, isoleucina e seus cetoácidos, os quais estão acumulados na doença do xarope do bordo.

Estudos *in vivo*, utilizando modelo experimental de hiperfenilalanina, também mostraram uma redução na atividade da Na⁺, K⁺-ATPase quando comparados aos animais controle; o mesmo acontecendo em modelo agudo de fenilcetonúria (Wyse et al., 1995).

1.6. Objetivos

Considerando as alterações neurológicas encontradas na hiperprolinemia tipo II, o papel da prolina como neurotransmissor e/ou neuromodulador e a importância da atividade da Na^+ , K^+ - ATPase para o funcionamento normal do sistema nervoso central, este trabalho teve como objetivos verificar:

1. a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase de membrana plasmática sináptica de hipocampo e de córtex cerebral em animais submetidos à administração crônica de prolina;
2. a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase de membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos jovens submetidos à administração aguda de prolina;
3. o efeito *in vitro* da prolina sobre a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase de membrana plasmática sináptica de hipocampo e de córtex cerebral de ratos;
4. o efeito *in vitro* do glutamato sobre a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase de membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos;

2.0 ARTIGOS

Artigo I

Proline administration decreases Na⁺, K⁺-ATPase activity in the synaptic plasma membrane from cerebral cortex of rats.

Zilda E.L. Pontes, Leandro S. Oliveira, Caren S. Bavaresco, Emilio L. Streck, Carlos S. Dutra-Filho, Moacir Wajner, Clóvis M.D. Wannmacher and Angela T.S. Wyse.

Metabolic Brain Disease, 14: 265-272, 1999.

Artigo II

Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity from rat hippocampus by proline.

Zilda Lopes Pontes, Leandro Silva Oliveira, Renata Franzon, Moacir Wajner, Clovis Milton Duval Wannmacher and Angela Terezinha de Souza Wyse.

Neurochemical Research, 26: 1321-1326, 2001.

Artigo I

Proline administration decreases Na⁺, K⁺-ATPase activity in the synaptic plasma membrane from cerebral cortex of rats.

Zilda E.L. Pontes, Leandro S. Oliveira, Caren S. Bavaresco, Emilio L. Streck,
Carlos S. Dutra-Filho, Moacir Wajner, Clóvis M.D. Wannmacher and Angela T.S. Wyse.

Metabolic Brain Disease, 14: 265-272, 1999.

Artigo II

Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity from rat hippocampus by proline.

Zilda Lopes Pontes, Leandro Silva Oliveira, Renata Franzon, Moacir Wajner, Clovis Milton Duval Wannmacher and Angela Terezinha de Souza Wyse.

Neurochemical Research, 26: 1321-1326, 2001

3.0 DISCUSSÃO

Hiperprolinemia tipo II é uma doença autossômica recessiva do metabolismo da prolina causada pela deficiência da enzima Δ^1 pirrolino-5-carboxilato desidrogenase que resulta no acúmulo tecidual deste aminoácido (Phang, 2001).

Embora não esteja bem estabelecido se hiperprolinemia tipo II é uma doença benigna ou se afeta o sistema nervoso central, alguns pacientes com quadro bioquímico de hiperprolinemia tipo II apresentam sintomas neurológicos da doença, como retardo mental, enquanto outros são clinicamente normais (Phang, 2001). Esses achados sugerem que níveis plasmáticos elevados de prolina e P5C não são suficientes para causar dano neurológico. Por outro lado, a manutenção de níveis aumentados de prolina, como os encontrados em pacientes hiperprolinêmicos, têm sido associados com predisposição à convulsões (Flynn, 1989).

Dados da literatura mostram que administração aguda subcutânea e intracerebral de prolina altera a formação de memória e aprendizado, podendo este ser um efeito neurotóxico de altos níveis de prolina no sistema nervoso central. Uma explicação para este fato seria que a prolina interferindo na liberação intracelular de glutamato em neurônios afetaria secundariamente a formação da memória (Cherkim, 1976; Moreira et al., 1989).

Evidências também mostram que altas concentrações de prolina ($\geq 100 \mu\text{M}$) ativam receptores NMDA (Ault, 1987; Henzi, 1992; Martin, 1992; Pace, 1992) AMPA (Henzi, 1992) e glicina-sensível a striquinina (Henzi, 1992; Nistri e Morelli, 1978) em cérebro de ratos. Com base nestes achados e naqueles que demonstram que a prolina tem alta afinidade por transportadores Na^+/Cl^- dependentes os quais são encontrados em neurônios glutamatérgicos é proposto que a prolina pode servir como um neuromodulador em neurotransmissão glutamatérgica (Fremeau, 1992; Nadler, 1992; Nadler e Cohen, 1995; Shafqat, 1995; Velaz-Faircloth, 1995; Fremeau, 1996). Por outro lado, os níveis aumentados de prolina e glutamato encontrados no líquido de pacientes com hiperprolinemia tipo II (Van Herreveld e Fifkova, 1973; Rohads, 1983; Phang, 2001), reforçam esta hipótese e indicam a possível ação excitotóxica de altas concentrações da prolina.

Os modelos animais de erros inatos do metabolismo têm contribuído para o entendimento do quadro clínico apresentado durante a instalação e desenvolvimento dessas doenças.

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.,

1987, Dutra et al., 1991) demonstraram que ratos tratados quimicamente com estes aminoácidos ou ácidos orgânicos apresentaram diminuição da atividade da Na^+ , K^+ - ATPase (Wyse et al., 1995; Wyse et al., 1998, Wyse et al., 2000), déficit no metabolismo energético (Dutra et al., 1991) e alterações comportamentais (Moreira et al., 1989; Dutra et al., 1991, Brusque et al., 1999).

A Na^+ , K^+ - ATPase é uma enzima chave na regulação do potencial de membrana, na manutenção do volume celular e no co-transporte de íons ligados ao Na^+ . A enzima é amplamente distribuída no cérebro e consome de 40-60% do ATP gerado neste tecido. A falência da Na^+ , K^+ - ATPase leva ao influxo celular de sódio e de cálcio e ao efluxo de potássio. Este movimento de íons gera despolarização nas células, ativando canais iônicos (Silver, 1997), podendo causar isquemia cerebral (Wyse, 2000), epilepsia (Grisar, 1984) e várias desordens neurodegenerativas (Lees, 1993).

No presente trabalho, utilizamos o modelo experimental de hiperprolinemia tipo II (Moreira et al., 1989) onde a administração de prolina inicia no 6^o dia de vida, período em que o cérebro apresenta maturação equivalente a um ser humano recém-nascido e finaliza no 28^o dia de vida, período em que o cérebro apresenta a maturação equivalente a de uma criança de 2 a 8 anos de idade (Loo, 1980).

Nossos resultados mostraram que os animais tratados cronicamente com prolina não apresentaram alterações nos pesos corporal, do encéfalo, do córtex cerebral e do hipocampo quando comparados com os controles (salina) (TABELAS 4 e 5). Também não observamos diferenças significativas na concentração de proteínas do homogenizado e membrana plasmática sináptica do hipocampo e do córtex cerebral dos ratos, em relação aos grupos controles (TABELAS 4.1 e 5.1). Estes resultados estão de acordo com outros modelos que utilizam aminoácidos, como por exemplo, o modelo experimental de hiperfenilalanina, utilizado por Wyse e colaboradores (1995), onde a administração de fenilalanina e metilfenilalanina, também não alterou o peso corporal, do encéfalo e do córtex cerebral dos animais tratados.

No tratamento crônico, onde os animais receberam 2 injeções diárias de prolina do 6^o ao 28^o dia de vida e foram sacrificados 12 horas após a última administração da droga, houve uma redução significativa na atividade da Na⁺, K⁺ - ATPase de membrana plasmática sináptica em torno de 20% em córtex cerebral e de 33% em hipocampo. Não houve alteração da Mg²⁺ -ATPase, indicando uma alteração específica da prolina sobre a Na⁺, K⁺ - ATPase.

Na administração aguda de prolina onde os animais com 15 dias de vida receberam uma única dose de prolina e foram sacrificados 1 hora após a

administração deste aminoácido, também houve uma diminuição significativa na atividade específica da Na^+ , K^+ - ATPase em torno de 41%, enquanto a atividade da Mg^{2+} -ATPase não foi alterada.

Alguns autores citam ser barreira a hemato-encefálica, quando madura, impermeável à prolina (Cherckin, 1977; Baxter, 1985; Davis 1987 - citados por Moreira, 1989). Nossos resultados da administração de prolina em ratos reforçam os achados de Moreira e colaboradores (1989) que, comparando níveis cerebrais de prolina em diferentes idades, notaram que quanto mais jovens os ratos, mais altos os níveis cerebrais de prolina e reforça a idéia de que a impermeabilidade da prolina ao sistema nervoso central é parcial e que este aminoácido pode acumular-se no sistema nervoso central nas primeiras semanas de vida, período de sinaptogênese e maturação pós-natal (Davis, 1984; Herschkowitz, 1982; Loo, 1980 - citados por Moreira, 1989).

De acordo com o estudo farmacocinético realizado em nosso laboratório (Moreira, 1989), os níveis séricos e cerebrais de prolina utilizados no tratamento em ratos foram de 1-2 mM e 30-60 μM , respectivamente, o que corresponde às doses de prolina encontradas no plasma e no líquido dos pacientes hiperprolinêmicos (Phang, 2001).

Nos experimentos *in vitro* a prolina nas concentrações de 1,0 e 2,0 mM inibiu significativamente a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase, não alterando a

atividade da Mg^{2+} - ATPase. Os mecanismos que envolvem esta inibição são ainda desconhecidos. Considerando que no tratamento *in vivo* a administração crônica de prolina resulta em níveis cerebrais baixos deste aminoácido (30-60 μM) o que inibe a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase e que nos estudos *in vitro* níveis também baixos de prolina (0,2 mM) não alteram a atividade desta enzima, torna-se difícil explicar a ação da prolina sobre a atividade cerebral da Na^+ , K^+ - ATPase em nossos estudos *in vivo*.

Por outro lado, é importante lembrar que a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase é complexa e que pode ser dividida em regulação de curta duração (short term), que ocorre em minutos e regulação de longa duração (long term) que envolve síntese e degradação de proteínas, o que ocorre em horas ou dias. A rápida regulação envolve mecanismos complexos como ativação de sinais, em resposta a estímulos, que ativam ou inibem proteínas quinases e fosfatases (Bertorello e Kats, 1995).

Esta complexa regulação da Na^+ , K^+ - ATPase indica que a regulação de curta duração (short term) pode estar envolvida em nossos ensaios *in vitro* e que a regulação de longa duração (long term) pode estar envolvida em nosso tratamento crônico.

A inibição da Na^+ , K^+ - ATPase está envolvida em lesões neurológicas no cérebro de ratos, em convulsões e encefalopatia espongiiforme em neonatos

humanos, estando ainda associada a excitotoxicidade (Sato e Nakazato, 1992; Renkawek, 1992; Lees, 1990; Lees, 1993). Neste contexto, tem sido proposto que lesões encontradas após crises epiléticas, isquemia e hipoglicemia, em que há inibição da Na^+ , K^+ - ATPase pode ser devido a liberação de glutamato endógeno (Ben-Ari, 1985; Choi e Rothman, 1990). Outros estudos, com achados similares, indicam que a inibição da Na^+ , K^+ - ATPase pode levar a morte celular por mecanismos dependentes de excitotoxinas (Cousin, 1995; Lees e Leong, 1995).

Para verificar o efeito *in vitro* do glutamato sobre a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase, testamos este aminoácido nas concentrações de 0,2; 1,0 e 2,0 mM. Os resultados mostraram que o glutamato também inibiu significativamente a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase de membrana plasmática sináptica de ratos nas concentrações de 1,0 e 2,0 mM. Este resultado foi semelhante ao encontrado com a prolina nas mesmas concentrações *in vitro*.

Nossos resultados referentes a inibição da enzima pelo glutamato estão de acordo com recentes estudos de outros pesquisadores os quais mostraram que o glutamato (1,0 mM) inibe a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase em sinaptossomas de cérebro de ratos (Avrova, 1999).

Considerando que a prolina não pode ser convertida em glutamato, em quantidades significativas no sistema nervoso central, presumimos que a

inibição da Na^+ , K^+ - ATPase, encontrada em nossos estudos *in vivo* e *in vitro*, foi devido ao efeito da prolina.

Outros trabalhos desenvolvidos em nosso grupo e, por outros pesquisadores, mostraram resultados diversos em relação a inibição da atividade da Na^+ , K^+ - ATPase por outros aminoácidos. A fenilalanina *in vivo* e *in vitro* e a arginina *in vivo* inibem a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase de cérebro de ratos (Wyse, 1999; Wyse, 2001). Por outro lado, a arginina *in vitro* (Silva, 1999) e soluções contendo histidina e β -alanina, não alteram a atividade desta enzima (Van der Hijden, 1989), estes achados indicam efeitos inibitórios específicos de alguns aminoácidos sobre a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase.

A inibição da atividade da Na^+ , K^+ - ATPase por prolina e glutamato, nas concentrações de 1,0 e 2,0 mM, nos levou a um estudo cinético de interação entre estes dois aminoácidos. Utilizando o modelo proposto por Chevillard et al. (1993), prolina e glutamato foram testados simultaneamente, utilizando-se diferentes concentrações de cada um dos aminoácidos, proporcionalmente crescente para um e decrescente para o outro. A concentração inicial escolhidas (1,0 mM) estava de acordo com a semelhança na percentagem de inibição de ambos compostos. A atividade enzimática foi determinada e plotada em gráfico tendo no eixo das ordenadas as diferentes

concentrações das substâncias utilizadas no sistema de incubação. A análise do gráfico indica que a prolina e o glutamato provavelmente competem por um mesmo sítio de ligação na enzima.

Os mecanismos que reduzem a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase em animais submetidos ao tratamento agudo e crônico com prolina permanecem desconhecidos, porque a regulação desta enzima a curto e a longo prazo é muito complexa e envolve muitos mediadores (Bertorello, 1995). Seguindo este raciocínio, alguns mecanismos podem ser responsáveis pelo efeito inibitório *in vivo* da administração de prolina sobre a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase: 1) degradação da enzima durante o tratamento crônico, quando sua síntese pode estar diminuída; 2) alterações causadas pela degradação da membrana fosfolipídica na qual a enzima está inserida, devido a peroxidação dos lipídios da membrana (Racay, 1994); 3) alteração estrutural na molécula protéica causada pela ação de radicais livres (Lees, 1991). Estas hipóteses, no entanto, devem ser testadas em estudos futuros para elucidar os mecanismos envolvidos.

Considerando que: a) a manutenção da atividade da Na^+ , K^+ - ATPase é crucial para a função cerebral normal e que a redução na atividade desta enzima está relacionada com danos neurológicos em cérebro de ratos e em humanos (Cousin, 1995; Lees, 1990; Lees e Leong, 1995); b) a prolina está

envolvida na transmissão glutamatérgica e na ativação de receptores NMDA (Cohen e Nadler, 1997; Ault, 1987; Henzi, 1992; Martin, 1992; Pace, 1992), c) pacientes hiperprolinêmicos apresentam aumento nas concentrações de glutamato e prolina no líquido e, considerando os nossos resultados que mostram uma redução na atividade da Na^+ , K^+ - ATPase, podemos postular que a redução na atividade desta enzima pode contribuir, pelo menos em parte, com o dano neurológico encontrado em pacientes sintomáticos com hiperprolinemia tipo II.

4.0 CONCLUSÕES

1. Os animais tratados cronicamente com prolina não apresentaram alterações no peso corporal, peso do encéfalo, do hipocampo e do córtex cerebral quando comparados com os animais controles. Também não foram encontradas alterações nas concentrações de proteínas do homogenizado e de membrana plasmática cerebral.
2. A atividade da Na^+ , K^+ - ATPase de membrana plasmática sináptica de hipocampo e de córtex cerebral de ratos reduziu significativamente nos animais submetidos ao modelo experimental crônico de hiperprolinemia tipo II.
3. Os animais submetidos à administração aguda de prolina apresentaram uma redução significativa na atividade da Na^+ , K^+ - ATPase de membrana plasmática sináptica de hipocampo.
4. A prolina nas concentrações de 1,0 e 2,0 mM, inibiu significativamente a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase de membrana plasmática sináptica de córtex cerebral de ratos *in vitro* .

5. A prolina e o glutamato, nas concentrações de 1,0 e 2,0 mM, inibiram significativamente a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase de membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos *in vitro* .

6. A análise do gráfico com os resultados do estudo cinético da interação entre a prolina e o glutamato sobre a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase de membrana plasmática sináptica de hipocampo de ratos mostrou que a atividade enzimática encontrada é muito semelhante para os dois aminoácidos indicando que a prolina e o glutamato competem por um mesmo sítio de ligação na enzima.

7. A prolina *in vivo* e *in vitro* não alterou a atividade da Mg^{2+} - ATPase de hipocampo e córtex cerebral de ratos.

É possível que a inibição na atividade da Na^+ , K^+ - ATPase possa estar envolvida nos mecanismos pelos quais a prolina é neurotóxica. Acreditamos que nossos resultados possam contribuir na compreensão da disfunção neurológica encontrada em pacientes portadores de hiperprolinemia tipo II

5.0 BIBLIOGRAFIA

- ALBERS, R.W., FAHN, S. & KOVAL, G.J. The role of sodium ions in the activation of electrophorus electric organ adenosine triphosphatase. Proc. Nat. Acad. Sci., USA 50:478-481, 1963.
- APPLEGARTH, D.A.; INGRAM, P.F.; HINGSTON, J.; HARDWICK, D.F. Hyperprolinemia type II. Clinical Biochemistry, 7:14-28, 1974.
- AULT, B. and NADLER, J.V. Evidence that L-proline selectively despolarizes pyramidal cells in the rat hippocampal slice. Soc. Neurosci. Abstr. 10: 229, 1984.
- AULT, B., WANG, C.M., and YAWN, B.C. L-Proline despolarizes rat spinal motoneurons by an excitatory amino acid-sensitive mechanism. Br. J. Pharmacol., 92:319-326, 1987.
- AVROVA, N.F., SHESTAK, K.I., ZAKHAROVA, I.O., SOKOLOVA, T.V., LEONTEV, V.G. The difference in the effect of glutamate and ON synthase inhibitor on free calcium concentration and Na⁺, K⁺-ATPase activity in synaptosomes from various brain regions. Neurochem. Res. 24:1101-1106, 1999.
- BEN-ARI, Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. Neurosci., 14:375-403, 1985.

- BENSON, P.F. & FENSON, A.H., Genetic Biochemical Disorders, Oxford: Oxford 692, University Press, p. 692, 1985.
- BERTORELLO, A .M., and KATS, A.L. Regulation of Na⁺-K⁺-Pump activity: pathways between receptors and effectors. NIPS, 10:253-259, 1995.
- BICKEL, H. Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. Enzyme, 38: 14-26, 1987.
- BLOSTEIN, R. Sodium activated adenosine triphosphatase activity of the erythrocyte membrane. J. Biol. Chem, 245:270-275, 1979.
- BLOSTEIN, R., PERSHADSINGH, H.A ., DRAPEAU, P. & CHU, L. Side-specificity of alkali cation interactions with Na, K,-ATPase: studies with inside-out red cell membrane vesicles. In SKOU, J.C. & NORBY, J.G. (Eds), Na,K-ATPase: Structure and Kinetics, London: Academic Press, pp 233-245, 1979.
- BRUSQUE, A .M., MELLO, C.F., BUCHANAN, D.N., TERRACCIANO, S.T., ROCHA, M.P., VARGAS, C.R., WANNMACHER, C.M., WAJNER, M. Effect of chemically induced propionic acidemia on neurobehavioral development of rats. Pharmacol. Biochem. Behav. 64(3): 529-534, 1999.

BÜRGER, C. Estudos experimentais na Doença do Xarope do Bordo: Efeito dos aminoácidos de cadeia ramificada e seus cetoácidos na atividade da Na^+ , K^+ - ATPase de membrana plasmática sináptica de córtex cerebral de ratos. Tese de mestrado pelo Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.

CHARNOCK, J.S. & POST, R.L. Evidence of the mechanism of ouabain inhibition of cation activated adenosine triphosphatase. Nature, 199: 910-911, 1963.

CHERKIN, A., ECKARDT, M.J., and GERBRANDT, L.H. Memory: proline induces retrograde amnesia in chicks. Science, 193:242-244, 1976.

CHEVILLARD, C., CARDENAS, M.L. e CORNISH-BOWDEN, A . The competition plot: a simple test of whether two reactions occur at the same active site. Biochem. J., 289:599-604, 1993.

CHOI, D.W. & ROTHMAN, S.M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. Annu. Ver. Neurosc., 13: 171-182, 1990.

COHEN, S.M. & NADLER, J.V. Proline-induced potentiation of glutamate transmission. Brain. Res., 761: 271-282, 1997.

- COUSIN, M.A., NICHOLLS, D.G. and POCOCK, J.M. Modulation of ion gradients and glutamate release in cultured cerebellar granule cells by ouabain. J Neurochem., 64: 2097-2104, 1995.
- DEAN, R.B. Theories of electrolyte equilibrium in muscle. Biol. Symp., 3:331-348, 1941.
- DUTRA, J.C., WAJNER, M., WANNMACHER, C.M., WANNMACHER, L.C., PIRES, R.F., ROSA-JUNIOR, A . Effect of postnatal methylmalonate administration on adult rat behavior. Braz J. Med. Biol. Res. 24 (6): 595-605, 1991.
- FLEMING, G.A ., HAGEDORN, C.H., GRANGER, A .S., PHANG, J.M. Pyrroline-5-carboxylete in human plasma. Metabolism 33: 739, 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 (normands). Arch. Dis. Child, 64: 1699-1707, 1989.
- FREMEAU, R.T., CARON, M.G., and BLAKELY, R.D. Molecular cloning and expression of a high affinity L-proline transpoter 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 nonopioid action of enkephalins: competitive inhibition of the mammalian brain high affinity L-proline transporter. Mol. Pharmacol., 49: 1033-1041, 1996.
- GERRING, K. Topic Review: Subunit assembly and functional maturation of Na, K -ATPase. J. Membrane Biol., 115: 109-121, 1990.
- GIUGLIANI, R. Erros inatos do metabolismo: uma visão panorâmica. Pediatria moderna. Vol. XXIII. 1: 29-40, 1988.
- GLYNN, I.M. Annual review prize lecture: all hands to the sodium pump. J. Physiol., 462: 1-30, 1993.
- GOODMAN, S.I., MACE, J.W., MILES, B.S., TENG, C.C., BROWN, S.B. Defective hydroxyproline metabolism in type II hyperprolinemia. Biochemical Medicine, 10: 329-336, 1974.
- GRISAR, T. Glial and neuronal Na⁺- K⁺ pump in epilepsy. Ann. Neurol. 16 (Suppl): 128-134, 1984.
- HANGLUND, M.M., STHAL, W.L., KUNKEL, D.D. and SCHWARTZKROIN, P.A. Developmental and regional differences in the localization of Na,K ATPase activity in the rabbit hippocampus. Brain Res., 343: 198-203, 1985.

- HENZI, V., REICHILING, D.B., HELM, S.W., and MacDERMOTT, A .B. L-Proline activates glutamate and glycine receptors in culture rat dorsal horn neurons. Mol. Pharmacol., 41: 793-801, 1992.
- HIATT, A ., McDOMOUGH, A. A . & EDELMAN, I.S. Assembly of the (Na⁺ + K⁺)-adenosine triphosphatase: Post-translational membrane integration of the α subunit. J. Biol. Chem., 259: 2629-2635, 1984.
- HOLTZMAN, N. Rare diseases, common problems: recognition and management. Pediatrics 62: 1056-1060, 1978.
- HOROWITZ, B.; EAKLE, K.A. ; SCHEINER-BOBIS, G. et al. Synthesis and assembly of function mammalian Na, K-ATPase in yeast. J. Biol. Chem., 265: 4189-4192, 1990.
- JACOBSON, I.R., HAGBERG, H., SANDBERG, M. and HAMBERGER, A. Ouabain-induced changes in extracellular aspartate, glutamate and GABA levels in the rabbit olfactory bulb in vivo. Neurosci.Lett., 64: 211-215, 1986.
- JORGENSEN, P.L. Mechanism of the Na⁺, K⁺ pump, protein structure and conformations of the pure (Na⁺ + K⁺)-ATPase. Biochem. Biophys. Acta, 694: 27-68, 1982.

KELLER, E.; DAVIS, J.L.; TACHIKI, K.H.; CUMMINS, J. e BAXTER C.F.

L-proline inhibition of glutamate release: Possible involvement in memory formation. Journal of Neurochem, 37: 1335-1337, 1981.

LEES, G.J., LEHMANN, A., SANDBERG, M., and HAMBERG, H. The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus. Neurosci. Lett, 120: 159-162, 1990.

LEES, G.J. Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potential ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. Brain Res. Rev. , 16: 283-300, 1991.

LEES, G.J. Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. Neuroscience, 54: 287-322, 1993.

LEES, G.J. and LEONG, W. Brain lesions induced by specific and non-specific inhibitors of sodium-potassium ATPase. Brain Res., 649: 225-233, 1995.

LEHNINGER, A .L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Principles of Biochemistry. Worth Publishers, Inc. New York, 3 Ed., 2000.

LINGREL, J.B. and KUNTZWEILER, T. Na⁺, K⁺ - ATPase. J. Biochem. Chem., 269: 196599-196662, 1994.

LOO, Y.H., FULTON, A., MILLER, K., WISNIEWSKI, M.H., Phenylacetate effects is synaptic development. Life Science, 27: 1280-1289, 1980.

- MARTIN, D., BRIAN, A. and NADLER, V. NMDA receptor-mediated despolarizing action of proline on CA1 pyramidal cells. Eur. J. of Pharmacology, 219: 59-66, 1992.
- MIXON A .J., GRANGER, A .N., PHANG, J.M.. Na 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. Pharmacol. Biochem. Behav., 32: 885-890, 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.
- OTON, D.S. and MARKOVSKA, L. Memory and hippocampal function as targets for neurotoxic substances. Neurotoxicology 15: 439-444, 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.
- PHANG, J.M., YET, G.C. and SCRIVER, C.R. Disorders of proline and hydroxyproline metabolism. In: SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L., SLY, W.S. and VALLE, D. eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease, McGraw-Hill, Inc., New York, 8th Ed., pp 1821-1838, 2001.
- POST, R.L., SEM, A .K. & ROSENTHAL, A .S. A phosphorylated intermediate in adenosine triphosphate-dependent sodium and potassium transport across kidney membranes. J. Biol. Chem., 240: 1437-1445, 1965.
- RACAY, P., BEZÁKOVÁ, G., KAPLÁN, P., LEHOTSKÝ, J. and MÉZESOVÁ, V. Alteration in rabbit brain endoplasmic reticulum Ca²⁺ transport by free oxygen radicals in vitro. Biochem. Biophys. Res. Commun. 199: 63-69, 1994.
- RENAUD, K.J., INMAN, E.M. & FAMBROUGH, D.M. Cytoplasmic and transmembrane domain deletions of Na⁺, K⁺-ATPase β -subunit : effects on subunit assembly and intracellular transport. J. Biol. Chem., 266: 20491-20497, 1991.
- RENKAWEK, K., RENIER, W. O ., DE PONT, J.J.H.H.M., VOGELS, O .J.M. and GABREELS, F.J.M. Neonatal status convulsivus, spongiform

- encephalopathy, and low activity of Na⁺/K⁺-ATPase in the brain. Epilepsy, 33: 58-64, 1992.
- ROHADS, D.E., PETERSON, N.A. and RAGHUPATHY, E. Selective inhibition of synaptosomal proline uptake by leucine and methionine enkephalins. J. Biol. Chem., 258: 122-133, 1983.
- SATOH, E. and NAKAZATO, Y. On the mechanism of ouabain-induced release of acetylcholine from synaptosomes. J. Neurochem., 58: 1038-1044, 1992.
- SCHULL, G.E, SCHWARTZ, A. & LINGREL, J.B. Amino-acid sequence of the catalytic subunit of the (Na⁺, K⁺)-ATPase deduced from a complementary DNA. Nature, 316: 691-695, 1985.
- SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L., SLY, W.S. and VALLE, D. eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease, McGraw-Hill, Inc., New York, 8th Ed., 2001.
- SHAFQAT, S., VELAZ-FAIRCLOTH, M., HENZI, V.A., WITNEY, K.D., YANG-FENG, T.L., SELDIN, 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.

- SILVA, C.G., PAROLO, E., STRECK, E.L., WAJNER, M., WANNMACHER, C.M.D. and WYSE, A .T.S. *In vitro* inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity from rat cerebral cortex by guanidino compounds accumulating in hyperarginemia. Brain. Res. 838: 78-84, 1999.
- SILVER, I.A . e ERECINSKA, M. Energetic demands of the Na⁺, K⁺-ATPase in mammalian astrocytes. Glia, 21: 35-45, 1997.
- SKOU, J.C. and ESMANN, M. The Na,K-ATPase. J. Bioenerg. Biomembr., 24: 249-261, 1992.
- STANBURY, 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. McGraw Hill, New York, 6^a ed. 3-59, 1983.
- USSING, H.H. The Developmnt of the Concept of Active Transport. In: The Na⁺, K⁺ - Pump, part B: Cellular Aspects. SKOU, J.C., NORBY, J.G., MAUNSBACH, A . B. and ESMANN, M., eds. P. 1-16. Alan Liss, New York. 1988.
- VAN DER HIJDEN, H.T., SCHUURMANS STEKHOVEN, F.M. and DE PONT, J.J. Sidedness of the effect of amines on the steady-state phosphorylation level of reconstituted Na⁺/K⁺-ATPase. Biochim. Biophys. Acta, 987: 75-82, 1989.

- VAN HERREVELD, A. and FIFKOVA, E. Effects of amino acids on the isolated chicken retina, and on its response to glutamate stimulation. J Neurochem., 20: 947, 1973.
- VAN HERREVELD, A. and FIFKOVA, E. Involvement of glutamate in memory formation. Brain Res., 81: 455-467, 1974.
- 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.
- VOET, D., VOET, J.G. Amino acid metabolism. In: Biochemistry, New York, John Wiley & Sons, Inc., 3 ed., 1999.
- WHITTAN, R. The dependence of the respiration of brain cortex on active cation transport. Biochem.J. 82: 205-212. 1962.
- WOO, A .L., JAMES P.F and LINGREL, J.B. Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na, K -ATPase. J. Biol. Chem. 275: 20693-20699, 2000.
- WYSE, A .T.S., BOLOGNESI, G., BRUSQUE, A. M. et al. Na⁺, K⁺ - ATPase activity in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats subject to chemically induced phenylketonuria. Med. Sci. Res.,23: 261-262, 1995.

- WYSE, A .T.S., NORILER, M.E., BORGES, L.F., FLORIANO, P.J., SILVA, C.G., WAJNER, M. and WANNMACHER, C.M.D. Alanine prevents the decrease of Na⁺, K⁺-ATPase activity in experimental phenylketonuria. Metab. Brain Dis. 14: 95-101, 1999.
- WYSE, A .T.S., STRECK, E.L., WORM, P., WAJNER, A ., RITTER, F. e NETTO, C.A . Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity after brain ischemia. Neurochem. Res. 25: 969-937, 2000.
- WYSE, A .T.S., BAVARESCO, C.S., BANDINELLI, C., STRECK, E.L., FRANZON, R., DUTRA-FILHO, C.S. and WAJNER, M. Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME prevents the decrease of Na⁺, K⁺-ATPase activity in midbrain of rats subjected to arginine administration. Neurochem. Res. 26: 515-520, 2001.

6.0 ANEXOS

TABELA 3 - Doses de prolina administradas, nos tratamentos crônico e agudo, de acordo com a idade dos ratos

-Estudos *in vivo*

Tratamento crônico

Controle - Salina

06 a 13 dias -12,8 $\mu\text{mol/g Pc}$

14 a 17 dias -14,6 $\mu\text{mol/g Pc}$

18 a 21 dias -16,4 $\mu\text{mol/g Pc}$

22 a 28 dias -18,2 $\mu\text{mol/g Pc}$

Tratamento Agudo

Controle - Salina

15 dias - 18,2 $\mu\text{mol/g Pc}$

* Pc = Peso corporal

TABELA 4 - Peso corporal, do encéfalo, cerebelo e córtex de ratos tratados do 6^o ao 28^o dia de vida e sacrificados 12 h após o término do tratamento. (Artigo I)

	Peso corporal(g)	Peso encéfalo(g)	Peso cerebelo(g)	Peso córtex(g)
Controle (salina)	55,4±15,5	0,99±0,9	0,19±0,2	0,58±0,6
Tratados (Prolina)	6,5±10,3	0,98±0,5	0,18±0,1	0,58±0,3

Os resultados estão expressos com média ± desvio padrão para 7 animais em cada grupo.

TABELA 4.1 - Concentração de proteínas em córtex cerebral de ratos tratados do 6^o ao 28^o dia de vida e sacrificados 12 h após o término do tratamento.(Artigo I)

Proteína	Controle (salina)	Tratado (prolina)
Mg/g homogeneizado de córtex	60,78±13,2	74,09±16,8
Mg/g membrana plasmática de córtex	24,57±3,45	24,71±5,43

Os resultados estão expressos com média \pm desvio padrão para 7 animais em cada grupo.

TABELA 5 - Peso corporal, peso do encéfalo, cerebelo, córtex e hipocampo de ratos tratados do 6^o ao 28^o dia de vida e sacrificados 12 h após o término do tratamento. (Artigo II)

	Peso Corporal(g)	Peso Encéfalo(g)	Peso cerebelar(g)	Peso Cortical (g)	Peso do hipocampo(g)
Controle (salina)	68,14±8,4	1,03±0,5	0,20±0,1	0,58±0,5	0,84±0,08
Tratado (prolina)	75,00±8,6	0,96±0,4	0,18±0,2	0,54±0,5	0,82±0,1

Os resultados estão expressos com média ± desvio padrão para 7 animais em cada grupo.

TABELA 5.1 - Concentração de proteínas em hipocampo de ratos tratados do 6^o ao 28^o dia de vida e sacrificados 12 h após o término do tratamento. (Artigo II)

Proteína	Controle (salina)	Tratado (prolina)
Mg/g homogeneizado de hipocampo	62,3±16,9	66,7±40,5
Mg/g membrana plasmática de hipocampo	20,4±3,5	19,8±4,6

Os resultados estão expressos com média \pm desvio padrão para 7 animais em cada grupo.