

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**EFEITO IN VITRO DAS SUBSTÂNCIAS ACUMULADAS NA DOENÇA DE  
LESCH-NYHAN SOBRE A ATIVIDADE DA Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase EM ESTRIADO  
DE RATOS**

**CAREN SERRA BAVARESCO**

**ORIENTADORA**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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, 2004

## RESUMO

A doença de Lesch-Nyhan é um erro inato do metabolismo das purinas caracterizado pela deficiência na enzima hipoxantina- guanina fosforibosiltransferase. O bloqueio dessa reação resulta no acúmulo tecidual de hipoxantina, xantina e ácido úrico. A doença caracteriza-se por hiperuricemia, variado grau de retardo mental e motor, espasticidade e auto-mutilação.

No sistema nervoso central, a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase é responsável pela manutenção da homeostase dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , regulando o volume celular, a excitabilidade neuronal, o transporte de neurotransmissores e outras moléculas. Evidências na literatura demonstram que a redução na atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase está relacionada com diversas doenças neurodegenerativas, tais como isquemia cerebral e doenças de Parkinson e de Alzheimer.

No presente estudo, investigamos o efeito *in vitro* da hipoxantina, xantina e ácido úrico sobre a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ - ATPase em membrana plasmática sináptica de estriado de ratos. Estudamos, também, a cinética de inibição causada pela hipoxantina e de interação entre hipoxantina, xantina e ácido úrico.

Nossos resultados demonstram que hipoxantina, xantina e ácido úrico inibem significativamente a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ - ATPase. O estudo dos mecanismos de inibição da atividade enzimática causados pela hipoxantina demonstrou um efeito inibitório não competitivo com o substrato ATP. Além disso, o estudo de interação cinética entre hipoxantina, xantina e ácido úrico sugere que esses compostos atuem em um mesmo sítio de ligação na enzima.

Verificamos, também, o efeito da preincubação de homogeneizado de estriado de ratos na presença de hipoxantina (10  $\mu\text{M}$ ) sobre a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ - ATPase de membrana plasmática sináptica com a adição ou não de antioxidantes (glutathiona e trolox), bem como alguns parâmetros de estresse oxidativo denominados TBARS (medida de lipoperoxidação)

e TRAP (capacidade antioxidante tecidual não-enzimática) no intuito de verificar a participação do estresse oxidativo nos mecanismos de inibição enzimática provocados pela hipoxantina. Os resultados mostraram que a hipoxantina inibe significativamente a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. Adicionalmente, nossos resultados demonstraram que glutathione, mas não o trolox, na concentração de 1 mM, foi capaz de prevenir a inibição enzimática causada pela hipoxantina. Nossos resultados também mostraram que a hipoxantina, na mesma concentração, aumentou TBARS e diminuiu TRAP que essa substância induz o estresse oxidativo.

É possível que a inibição na atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase possa estar envolvida nos mecanismos pelos quais as oxipurinas são neurotóxicas. Acreditamos que nossos resultados possam contribuir, pelo menos em parte, na compreensão da disfunção neurológica encontrada em pacientes portadores da doença de Lesch-Nyhan.

## ABSTRACT

The Lesch-Nyhan (LN) disease is an inherited metabolic disorder of the purine metabolism caused by a severe deficiency on hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) activity, an enzyme involved on purine salvage, resulting in tissue accumulation of hypoxanthine, xanthine and uric acid. Affected patients present overproduction of uric acid, neurological disability, varying degrees of cognitive disorder, choreoatetosis, spasticity, mental retardation. The most unusual feature is the occurrence of self-mutilation behavior, characterized by biting of the lips, tongue and fingers with apparent tissue loss.

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase is an enzyme embedded in the cell membrane, responsible for the generation of the membrane potential through the active transport of sodium and potassium ions in the central nervous system necessary to maintain neuronal excitability. Some evidences demonstrated that the enzyme activity is inhibited in ischaemia, in epilepsy and in many neurodegenerative disorders.

In the present study, we investigate the in vitro effect of hypoxanthine, xanthine and uric acid on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase activity in synaptic plasma membrane from rat striatum. We also studies the kinetics of the inhibition caused by hypoxanthine and the interaction between hypoxanthine, xanthine and uric acid.

Results show that hypoxanthine, xanthine and uric acid significantly inhibited  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase activity and also indicated that the inhibition of this enzyme caused by hypoxanthine was the non-competitive type. In addition, the horizontal straight line obtained in the resulting competition plot indicates that the inhibitory activities of hypoxanthine, xanthine and uric acid occur in a common site of the enzyme.

We also investigate the effect of preincubation of striatum homogenate in the presence of hypoxanthine on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in synaptic plasma membrane of rats and the role

of the antioxidants glutathione (GSH) and trolox (soluble vitamin E) on the effects elicited by hypoxanthine on the enzyme activity. In addition, we investigated some parameters of oxidative stress namely total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) and thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) in rat striatum.

Our results also show that hypoxanthine significantly inhibited  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase activity. *Post hoc* analyses showed that GSH and trolox *per se* did not alter  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity. However, when GSH was incubated in the presence of hypoxanthine, no effect on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity was detected, in contrast to trolox, which did not prevent the inhibition of the enzyme activity elicited by hypoxanthine. In order to confirm whether the inhibitory effect of hypoxanthine on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity could be attributed to decreased antioxidant defenses, peroxidation of lipid membrane and/or oxidative stress. We verified that hypoxanthine significantly increased TBA-RS and decreased TRAP, indicating oxidative stress participation in the inhibitory effect elicited by hypoxanthine.

Since oxypurines concentrations in plasma of children with Lesch-Nyhan are the same order of magnitude as those tested *in vitro*, the results suggest that reduction of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity may contribute to the neurological dysfunction found in patients affected by Lesch-Nyhan syndrome.

## SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	01
1.1. ERROS INATOS DO METABOLISMO.....	01
1.2. Erros Inatos Do Metabolismo Das Purinas.....	04
1.2.1. Metabolismo das Purinas.....	04
1.2.2. Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase.....	09
1.3. LESCH-NYHAN.....	10
1.3.1. Conceito e Histórico.....	10
1.3.2. Sinais e sintomas.....	12
1.3.3. Patogênese.....	14
1.3.4. Achados laboratoriais.....	15
1.3.5. Tratamento.....	16
1.4. Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase .....	18
1.4.1. Histórico.....	18
1.4.2. Conceito, função e estrutura.....	19
1.4.3. Mecanismo de Ação.....	23
1.4.4. Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase e o Sistema Nervoso Central.....	26
1.5. OBJETIVOS.....	29
2.0. ARTIGOS.....	30
3.0. DISCUSSÃO.....	33
4.0. CONCLUSÕES.....	42
5.0. PERSPECTIVAS.....	44
6.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Classificação dos erros inatos do metabolismo.....	3
--	---

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Estrutura das bases purínicas e oxipurinas.....	5
<b>FIGURA 2:</b> Rotas do metabolismo das purinas.....	8
<b>FIGURA 3:</b> Síndrome de Lesch-Nyhan.....	11
<b>FIGURA 4:</b> Representação esquemática da $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ - ATPase.....	21
<b>FIGURA 5:</b> Mecanismo de ação da enzima $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ - ATPase.....	25



**Dedico essa dissertação àquelas pessoas  
as quais eu tenho o privilégio de chamar  
de família...**

**... Meus pais e minha irmã.**

**Senhor,  
faça de mim um instrumento de vossa paz!  
Onde houver ódio, que eu leve o amor;  
Onde houver ofensa, que eu leve o perdão;  
Onde houver discórdia, que eu leve a união;  
Onde houver dúvida, que eu leve a fé;  
Onde houver erro, que eu leve a verdade;  
Onde houver tristeza, que eu leve a alegria;  
Onde houver trevas, que eu leve a luz!**

**(Oração de São Francisco)**

## **Agradecimentos**

- \* À professora orientadora Angela T.S. Wyse pelo incentivo, amizade, companheirismo e por ser um exemplo profissional a ser seguido. Obrigada por ter tornado esse sonho possível!
- \* Aos professores Clovis M. D. Wannmacher, Moacir Wajner e Carlos S. Dutra-Filho pelos ensinamentos.
- \* A Cleide G. Silva por ter me ensinado os primeiros passos na pesquisa científica.
- \* Aos colegas do laboratório 34 pelo companheirismo e incentivo durante essa caminhada.
- \* Aos funcionários, professores, colegas e amigos que fiz neste departamento.
- \* Aos meus pais, João Baptista Bavaresco e Rosa Maria Serra Bavaresco, pelo amor, carinho e dedicação ao longo de todos os anos de minha vida. Amo vocês.
- \* À minha irmã, Andréa Serra Bavaresco, por ser simplesmente o máximo.
- \* Aos meus avós, Manoel Gonçalves Serra e Alice Teixeira Serra, e minha tia, Liane Teixeira Serra, pelo incentivo e carinho.
- \* À Regina M. dos Santos pelo amor e carinho que tem dedicado a mim ao longo de 21 anos.
- \* À Izabel M. Maciel e família por ter me acolhido e incentivado durante todos os momentos.

\* Aos meus amigos que lutaram comigo durante todo esse tempo.

\* A Deus por ter me dado uma vida maravilhosa.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- **ADA:** adenosina desaminase;
- **ADP:** adenosina difosfato;
- **AK:** adenosina kinase;
- **AMP:** adenosina monofosfato;
- **APRT:** adenina fosforibosiltransferase;
- **AS:** adenina succinato;
- **ASL:** adenina succinato sintase/liase;
- **ATP:** adenosina trifosfato;
- **5'NT:** 5'- nucleotidase;
- **GA:** guanase;
- **GDP:** guanina difosfato;
- **Gly:** glicina;
- **GMP:** guanosina monofosfato;
- **GSH:** glutationa reduzida;
- **GSSG:** glutationa oxidada;
- **GTP:** guanosina trifosfato;
- **HGPRT:** hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase;
- **IDH:** IMP desidrogenase;
- **IMP:** inosina monofosfato;
- **LN:** Lesch Nyhan
- **PP-ribose-P:** fosforibosilpirofosfato;
- **XA:** ácido xantílico;
- **XO:** xantina oxidase.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Erros Inatos do Metabolismo:**

Em 1908, Sir Archibald Garrot introduziu o termo Erros Inatos do Metabolismo (EIM) para as alterações genéticas que se manifestam pela síntese de uma proteína anômala, geralmente uma enzima, ou através da diminuição ou ausência de sua síntese, resultando no bloqueio da rota metabólica envolvida. Como consequência, podem ocorrer tanto o acúmulo de metabólitos tóxicos como a falta de produtos essenciais, ambos com doença subsequente (BICKEL, 1987).

Os EIM apresentam-se relativamente freqüentes em seu conjunto, podendo atingir 1 em cada 100 recém-nascidos vivos (GIUGLIANI, 1988). Até o momento, foram descritos mais de 500 EIM (SCRIVER et al, 2001), envolvendo processos de transporte, armazenamento e síntese de biomoléculas.

O tratamento dos EIM é mais bem sucedido quanto mais precoce for o seu diagnóstico e pode ser abordado de diferentes formas:

- 1) Limitando a entrada do precursor (como por exemplo, na fenilcetonúria através do controle da ingestão de fenilalanina);
- 2) Suplementando o metabólito ausente (como por exemplo, no hipotireoidismo, administrando-se tiroxina);
- 3) Inibindo o acúmulo de determinada substância;

- 4) Controlando fatores desencadeantes;
- 5) Aumentando a atividade enzimática (através do aumento de piridoxina na homocistinúria);
- 6) Inibindo a formação da substância acumulada (como no caso da gota, através da inibição da xantina oxidase com alopurinol);
- 7) Suplementando a proteína não enzimática deficiente;
- 8) Suplementando a enzima deficiente.

Os EIM envolvem as mais diferentes áreas do metabolismo, conforme demonstrado na Tabela 1. Dentre os erros inatos do metabolismo das purinas, destaca-se a síndrome de Lesch-Nyhan, caracterizada pela deficiência na enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, resultando em acúmulo tecidual de hipoxantina, xantina e ácido úrico (JINNAH & FRIEDMANN, 2001).

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS ERROS INATOS DO METABOLISMO (EIM) DE ACORDO COM AS ÁREAS DO METABOLISMO ENVOLVIDAS:

EIM dos aminoácidos

EIM dos ácidos orgânicos

EIM das purinas e pirimidinas

EIM dos glicídios

EIM dos lipídios

EIM dos glicosaminoglicanos

EIM das glicoproteínas

EIM das enzimas eritrocitárias

EIM dos metais

EIM das lipoproteínas

EIM dos hormônios

EIM das proteínas plasmáticas



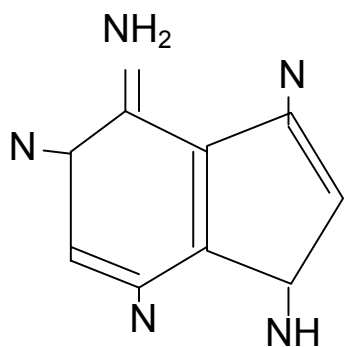
## **1.2.ERROS INATOS DO METABOLISMO DAS PURINAS**

### **1.2.1. Metabolismo das Purinas**

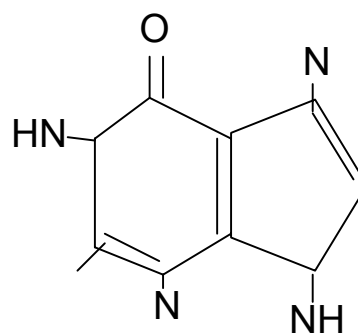
As principais bases púricas encontradas nas células são adenina e guanina, as quais podem formar nucleosídeos através da incorporação de ribose ou 2-desoxirribose ao anel purínico. A adição de ésteres de fosfato nesses nucleosídeos resulta na formação de nucleotídeos purínicos os quais desempenham um importante papel no metabolismo celular (CORY, 1998), dentre as quais podemos destacar:

- a) Papel no metabolismo energético celular, tendo em vista que o ATP é a principal fonte energética;
- b) Constituintes monoméricos dos ácidos nucléicos;
- c) Mediadores fisiológicos, exercendo papéis de segundos mensageiros;
- d) Componentes de coenzimas;
- e) Efetores alostéricos.

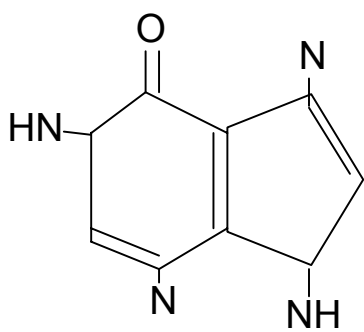
Paralelamente, outra classe de derivados purínicos, as oxipurinas tais como hipoxantina e xantina apresentam um importante papel no metabolismo celular (BALIS, 1976). As estruturas moleculares das bases purínicas e oxipurinas podem ser observadas na figura 1.



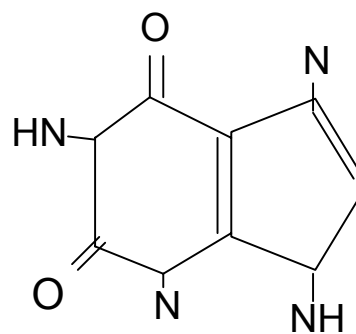
Adenina



Guanina



Hipoxantina



Xantina

Figura 1: Estrutura das bases purínicas (adenina e guanina) e oxipurinas (hipoxantina e xantina).

O fornecimento de purinas para pool celular depende das vias de síntese de novo, recuperação ou através da degradação de nucleosídeos exógenos. A via de síntese de novo das purinas consiste em diversos passos metabólicos, utilizando grande quantidade de ATP celular para fornecimento de energia (ROSSITER & CASKEY, 1995).

A biossíntese de novo inicia com a doação de um grupo amino pela glutamina ao fosforibosilpirofosfato (PP-ribose-P), resultando em 5-fosforribosilamina, com subsequente adição de 3 moléculas do aminoácido glicina e hidrólise de uma molécula de ATP. Posteriormente, ocorre a doação de um nitrogênio a partir da glutamina e liberação de 5-aminoimidazol ribonucleotídeo. Um grupamento carboxila é incorporado a partir do bicarbonato presente nas soluções aquosas, concomitantemente com o grupamento amina proveniente do aspartato e do grupo carboxila do N<sup>10</sup>-formiltetraidrofolato, resultando na formação de inosinato (IMP) (LEHNINGER et al., 1995).

A via de recuperação utiliza hipoxantina, guanina e adenina como substrato para a ação de fosforibosiltransferases. Essas enzimas transferem a ribose fosfato do fosforibosilpirofosfato para a base purínica em presença de magnésio. Adenina fosforibosiltransferase (APRTase) converte adenina em AMP, enquanto a enzima hipoxantina – guanina fosforibosiltransferase (HGPRT) age sobre hipoxantina ou guanina para formar IMP ou GMP, respectivamente. Essa rota de recuperação conserva energia e permite que as células formem nucleotídeos a partir de bases pré-existentes, tendo em vista que 90% das purinas livres geradas durante o

metabolismo intracelular provêm da rota de salvação (JINNAH & FRIEDMANN, 2001).

Os níveis intracelulares de purinas também podem ser mantidos através da incorporação de purinas livres e nucleosídeos produzidos no meio extracelular. A incorporação desses compostos depende da atividade das enzimas envolvidas na rota de regeneração das purinas.

A via de degradação das purinas envolve as enzimas 5'-nucleotidase, purina nucleosídeo fosforilase, xantina oxidase, guanase e adenosina desaminase, obtendo-se como produto final ácido úrico, o qual pode ser facilmente excretado (VISSER at al., 2000, JINNAH & FRIEDMANN, 2001). Xantina pode ser obtida através da degradação da guanina pela enzima guanase ou pela ação da enzima xantina oxidase sobre a hipoxantina. Xantina pode ser convertida em ácido úrico, produto final do metabolismo das purinas, através da enzima xantina oxidase (VISSER at al., 2000).

Hipoxantina, por sua vez, atua como um intermediário ativo nas células, podendo ser degradada pela enzima xantina oxidase, formando xantina ou formar inosina monofosfato (IMP) através da ação da enzima hipoxantina-guanina fosforibosilpirofosfato. Esta reação é responsável pela manutenção do "pool" de hipoxantina intracelular, o qual será utilizado na conversão de produtos úteis para as células (BALIS, 1976).

Uma visão geral da rota de síntese e degradação das purinas pode ser observada na figura 2.

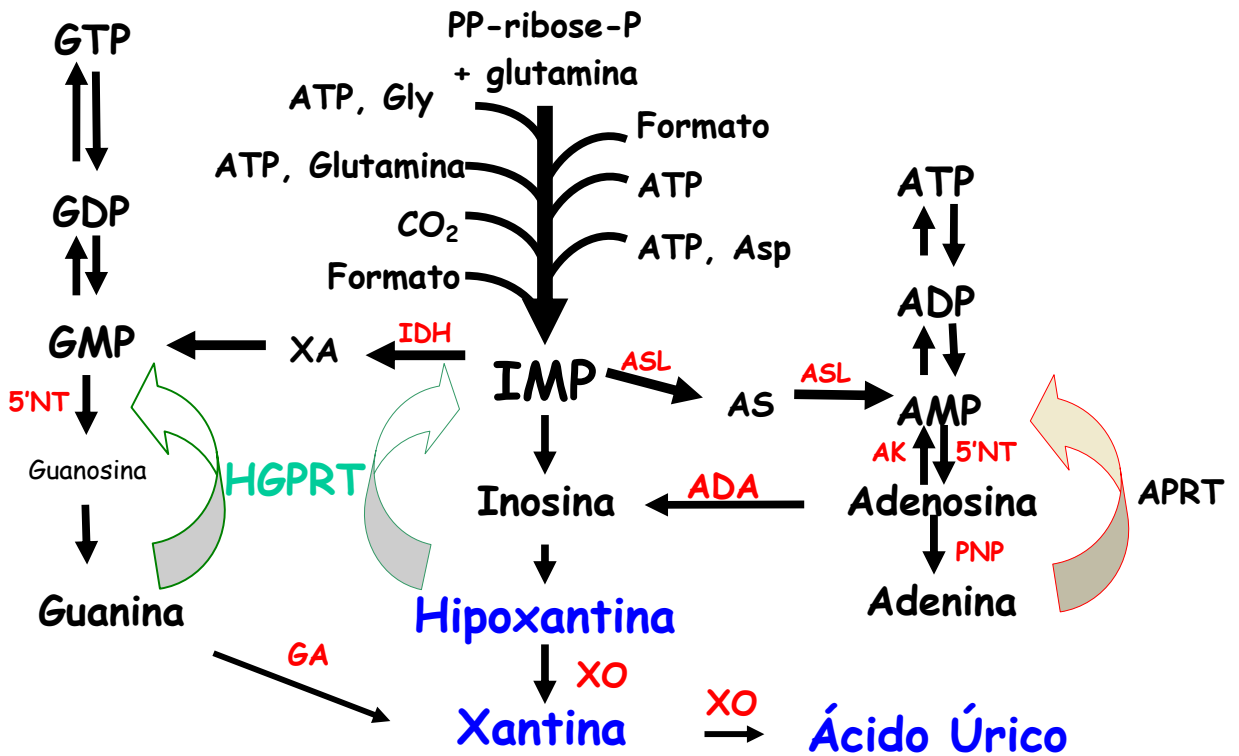


Figura 2: Rotas do metabolismo das purinas. Abreviações utilizadas: HGPRT, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase; ADP, adenosina difosfato; AMP, adenosina monofosfato; ATP, adenosina trifosfato; GA, guanase; GDP, guanina difosfato; GMP, guanosina monofosfato; GTP, guanosina trifosfato; Gly: glicina; IMP, inosina monofosfato; PP-ribose-P, fosforibosilpirofosfato; XO, xantina oxidase; 5'NT: 5'- nucleotidase; ADA: adenosina desaminase; AK: adenosina kinase; APRT: adenina fosforibosiltransferase; AS: adenina succinato; ASL: adenina succinato sintase/liase; XA: ácido xantílico, IDH: IMP desidrogenase.

### **1.2.2. Hipoxantina-Guanina Fosforibosilpirofosfato (E.C. 2.4.2.8)**

A enzima hipoxantina-guanina fosforibosilpirofosfato (HGPRT) é responsável pela transferência da fosforibose presente na molécula de PP-ribose-P para a posição nove da hipoxantina ou guanina, tem peso molecular de 24.470 Da, com aproximadamente 218 aminoácidos por monômero (ROSSITER & CASKEY, 1995). Adicionalmente, estudos sugerem o envolvimento da HGPRT no metabolismo do ácido ribonucléico (RNA) (HENDERSON, 1965).

A HGPRT é composta por duas subunidades ( $\alpha$  /  $\beta$ ), aparentemente idênticas. Sua cinética de reação segue um mecanismo complexo e dependente do íon  $Mg^{2+}$ . Os substratos enzimáticos principais são hipoxantina, guanina e PP-ribose-P, entretanto alguns trabalhos sugerem que a HGPRT tem pouca afinidade pela xantina (SEEGMILLER, 1976).

A HGPRT apresenta-se amplamente distribuída nos tecidos, especialmente no sistema nervoso central, sendo que, particularmente, os gânglios da base são dependentes da atividade dessa enzima para manutenção dos níveis de purinas teciduais através da via de reutilização (MORIWAKI et al., 1999, VISSER, 2000). Uma relação entre o estágio de desenvolvimento neonatal e a atividade da HGPRT

tem sido demonstrada, principalmente entre o nascimento e a terceira semana de vida (ROSSITER & CASKEY, 1995).

Mutações gênicas levam a perda parcial ou total da atividade da HGPRT, apresentando redução acentuada na afinidade por hipoxantina, guanina e PP-ribose-P, com conseqüente acúmulo desses compostos (SEEGMILLER, 1976, ROSSITER & CASKEY, 1995).

Tendo em vista a vital importância dos compostos purínicos e da atividade da enzima HGPRT para o metabolismo das purinas, defeitos enzimáticos ou na via de regeneração das purinas resultam em síndromes. Dentre elas, ressalta-se a síndrome de Lesch-Nyhan a qual é caracterizada pela deficiência na enzima HGPRT, pelo acúmulo tecidual de oxipurinas e por pronunciadas alterações no sistema nervoso central (JINNAH & FRIEDMANN, 2001).

### **1.3. LESCH –NYHAN**

#### **1.3.1 Conceito e Histórico**

A síndrome de Lesch-Nyhan é um erro inato do metabolismo associado à herança autossômica recessiva ligada ao sexo. Caracteriza-se pela deficiência na enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT, E.C. 2.4.2.8) a qual catalisa a conversão de hipoxantina e guanina em seus respectivos nucleotídeos IMP e GMP, conseqüentemente a hipoxantina não pode ser convertida a IMP

(NYHAN, 1978, MATEOS et al., 1991, VISSER et al., 2000, JINNAH & FRIEDMANN, 2001). Além disso, ocorre um aumento da via de síntese de novo das purinas decorrente da ineficiência na rota de regeneração (TORRES-JIMÉNEZ et al., 1998). Essas alterações acarretam o acúmulo tecidual de hipoxantina, xantina e ácido úrico. A figura 3 demonstra, esquematicamente, a rota acima citada.

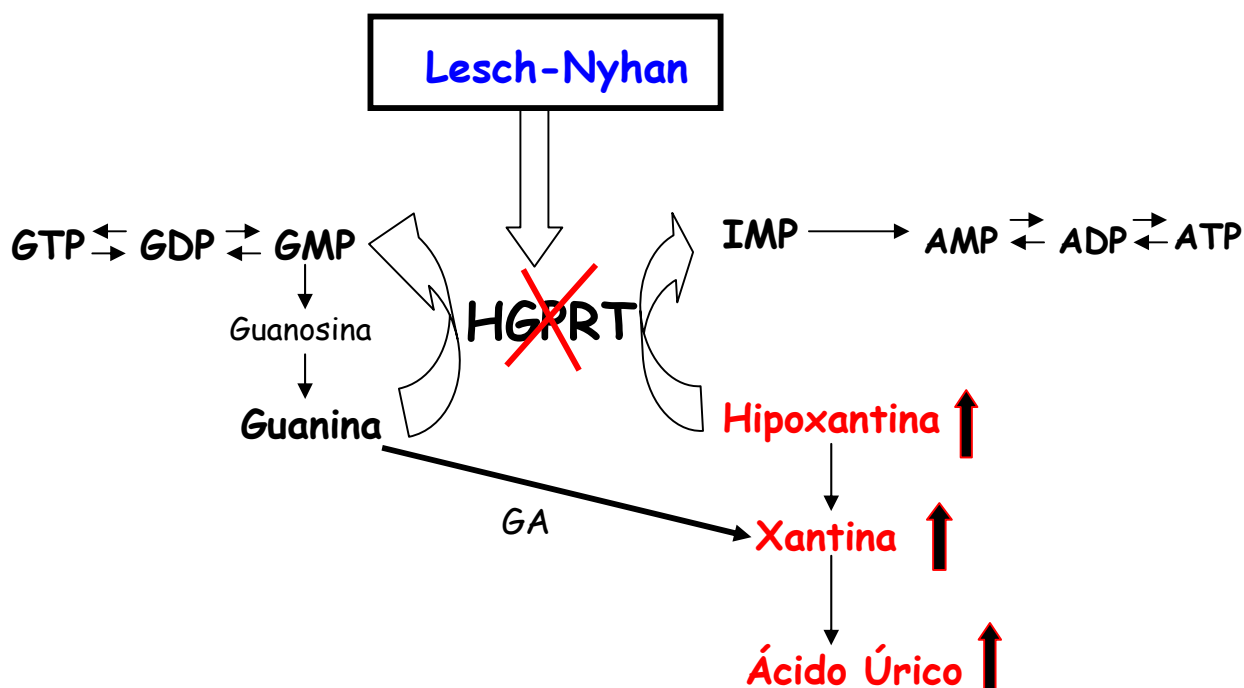


Figura 3: Síndrome de Lesch-Nyhan. Abreviações utilizadas: HGPRT, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase; ADP, adenosina difosfato; AMP, adenosina monofosfato; ATP, adenosina trifosfato; GA, guanase; GDP, guanina



difosfato; GMP, guanosina monofosfato; GTP, guanosina trifosfato; IMP, inosina monofosfato; PP-ribose-P, fosforibosilpirofosfato; XO, xantina oxidase.

O primeiro caso da doença foi publicado em 1964 por Lesch e Nyhan os quais descreveram dois irmãos apresentando hiperuricemia e alterações neurológicas, incluindo disfunção motora e automutilação (LESCH & NYHAN, 1964). Entretanto a relação entre a deficiência na atividade da HGPRT e a doença de Lesch-Nyhan somente foi demonstrada em 1967 (SEEGMILLER et al., 1967). Atualmente, a doença de Lesch-Nyhan apresenta incidência aproximada de 1/ 100.000 nascidos vivos (DeANTONIO et al., 2002).

### **1.3.2 Sinais e Sintomas**

Os sintomas clínicos da doença parecem estar relacionados com a atividade residual da enzima HGPRT. Pacientes com pelos menos 8% da atividade enzimática residual apresentam acentuada produção de ácido úrico, associada com nefrolitíase, hiperuricemia e gota, enquanto pacientes portadores de atividades enzimáticas entre 1,5 e 8% em comparação ao controle apresentam elevadas concentrações de ácido úrico plasmáticas, conjuntamente com alterações neurológicas envolvendo os sistemas piramidais e extrapiramidais (TORRES-JIMÉNEZ et al., 1998).

Pacientes portadores da síndrome de Lesch-Nyhan geralmente apresentam atividade da HGPRT inferior a 1,5 %. Clinicamente essa doença caracteriza-se por retardo mental, alterações motoras e cognitivas, aliado a hiperuricemia, gota e a automutilação, a qual é caracterizada por mordeduras de lábios, língua e dedos, com

aparente perda tecidual (HENDERSON, 1968, EDWARDS et al., 1979, JINNAH et al., 1990).

Geralmente, as crianças afetadas por essa doença parecem normais ao nascimento, desenvolvendo as primeiras manifestações clínicas ao redor de 3 a 6 meses de vida (JINNAH & FRIEDMANN, 2001). A característica mais notável nesse período é o atraso do desenvolvimento motor acompanhado de retardo mental.

Ao final do primeiro ano de vida, a maioria das crianças afetadas apresenta transtornos extrapiramidais tais como distonia e coreoatetosis. No segundo ano após o nascimento, aparecem as alterações piramidais tais como hiperflexia e hipertonia dos músculos adutores das pernas (DeANTONIO et al., 2002).

A manifestação clínica mais característica é a automutilação, a qual ocorre em 85% dos casos da doença (NYHAN, 1973). O desenvolvimento desse comportamento inicia, aparentemente, no segundo ano de vida, e coincide com o término de erupção da dentição decídua. O comportamento automutilador tende a diminuir com o aumento do autocontrole, ao redor dos 12 anos de idade. Os pacientes portadores de Lesch-Nyhan possuem sensibilidade dolorosa e parecem sofrer com essa conduta (VISSER et al., 2000, DeANTONIO et al., 2002).

No sistema nervoso central, estudos neuroquímicos demonstraram uma redução seletiva do conteúdo dopaminérgico no estriado, similares àqueles encontrados em pacientes portadores do mal de Parkinson (VISSER et al., 2002). Todavia, a

correlação entre a deficiência na atividade da enzima HGPRT e a redução dos níveis de dopamina não está esclarecido. Autores sugerem que o estresse oxidativo estaria envolvido no processo de deteriorização estriatal, através de um mecanismo similar ao encontrado no mal de Parkinson. Além disso, a dependência estriatal da atividade da HGPRT para a manutenção dos níveis de purinas, aliado a diminuição dos prolongamentos dos neurônios dopaminérgicos poderiam contribuir para o aparecimento dessa disfunção (PAULMOR et al., 1989, LOEFFLER et al., 2000, JINNAH & FRIEDMANN, 2001).

### **1.3.3 Patogênese**

Diversas hipóteses foram formuladas para explicar os mecanismos envolvidos na patogênese da Lesch-Nyhan, tais como estresse oxidativo, deficiência na síntese de metabólitos essenciais, aumento na síntese de novo das purinas e o acúmulo de metabólitos tóxicos (JINNAH & FRIEDMANN, 2001).

Evidências na literatura indicam uma relação entre a patogênese da síndrome de Lesch-Nyhan e os metabólitos acumulados na deficiência da HGPRT (GEDYE, 1992, MA et al., 2001). O marcante aumento na produção e excreção de ácido úrico, assim como o acúmulo das oxipurinas hipoxantina e xantina poderiam causar um efeito tóxico para o sistema nervoso central (KISCH et al., 1985, GEDYE, 1992, MA et al., 2001, LOEFFLER et al., 2000, JINNAH & FRIEDMANN, 2001).

Evidências mostram que a hipoxantina e a xantina podem ligar-se a receptores benzodiazepínicos e interferir na função normal desses receptores (TICKU & BURCH, 1980). Por outro lado, Geyde (1992) relacionou a elevada concentração de xantina no plasma de pacientes com Lesch-Nyhan com o desencadeamento de uma cascata de reações que culminam com aumento excessivo de ácido quinolínico e quinurenina e a diminuição de serotonina e GABA. Aliado a isso, Palmour e colaboradores (1989) demonstraram que o acúmulo de hipoxantina provoca depleção de dopamina em cultura de células neuronais.

Entretanto, os mecanismos pelos quais esses compostos atuam no sistema nervoso central e o papel dos mesmos no dano neurológico presente na Lesch-Nyhan ainda permanecem desconhecidos.

#### **1.3.4. Achados laboratoriais**

O diagnóstico pré-natal pode ser realizado através da análise da atividade da HGPRT em amostras de sangue e líquido amniótico da gestante. Durante o primeiro trimestre da gravidez, a composição do líquido amniótico é similar aos fluidos extracelulares do feto, sendo amplamente utilizado para o diagnóstico de doenças hereditárias. O risco de mortalidade para o feto durante a realização da punção no cordão umbilical é baixa (1,9%) durante a 20ª semana de gestação e os valores obtidos para as concentrações de oxipurinas são fidedignos (MATEOS et al., 1991).

Exames laboratoriais do conteúdo de ácido úrico e presença de cristais de ácido úrico na urina são realizados para confirmação do diagnóstico. Crianças afetadas pela síndrome de Lesch-Nyhan podem excretar de 20 a 70 mg de ácido úrico por quilograma de peso corporal (SEEGMILLER, 1976).

A análise dos níveis séricos de ácido úrico, hipoxantina e xantina também contribuem para a determinação do diagnóstico definitivo (SWEETMAN, 1968, HARKNESS, 1988, PUIG et al., 1989, MATEOS et al., 1991). Os valores obtidos para as oxipurinas em plasma indivíduos normais correspondem a 1,7  $\mu\text{M}$  para hipoxantina, 2,5  $\mu\text{M}$  para xantina e 0,15 mM para ácido úrico. Em pacientes portadores da síndrome de Lesch-Nyhan estas concentrações podem atingir valores de 10  $\mu\text{M}$  para hipoxantina, 2,5  $\mu\text{M}$  para xantina e 0,7 mM para ácido úrico (PUIG et al., 1989).

As concentrações de hipoxantina e xantina também se encontram elevadas no líquido cérebro-espinhal dos indivíduos portadores da doença (SWEETMAN, 1968). Entretanto, os valores de ácido úrico apresentam-se normais ou ligeiramente elevados (VISSER et al., 2000, JINNAH & FRIEDMANN, 2001).

### **1.3.5. Tratamento**

Em geral, as terapias usadas para a doença de Lesch-Nyhan apresentam um enfoque estritamente sintomático. A fim de evitar as complicações renais, utiliza-se

alopurinol (5 a 10 mg/ kg/ dia), inibidor da enzima xantina oxidase, com o intuito de diminuir a produção de ácido úrico. Essa terapia é eficiente no tratamento da hiperuricemia e nefrolitíase, entretanto não apresenta efeito sobre as manifestações neurológicas e comportamentais da doença. Além disso, é necessário o controle na ingesta protéica (VISSER et al., 2000, DeANTONIO et al., 2002).

Alguns fármacos têm sido utilizados como alternativa de tratamento para as alterações cerebrais características da Lesch-Nyhan. Estudos demonstraram que o uso de 5-hidroxitriptofano reduz a irritabilidade nos pacientes, porém provoca sedação e não é eficaz para conter os impulsos automutiladores (DeANTONIO et al., 2002).

O uso de adenina como alternativa terapêutica tem como objetivo diminuir a síntese de novo das purinas e a síntese de ácido úrico, porém alguns autores demonstraram o desenvolvimento de insuficiência renal durante o tratamento com essa substância (BUHRDEL et al., 1985).

O envolvimento do sistema dopaminérgico no desenvolvimento da Lesch-Nyhan impulsionou o estudo do efeito de antagonistas de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> sobre as alterações neurológicas presentes na doença. Todavia, os efeitos adversos extrapiramidais provocados pelo bloqueio dos receptores D<sub>2</sub> do estriado desaconselharam sua indicação (DeANTONIO et al., 2002).

Os problemas relacionados com o comportamento e, particularmente, as manifestações autodestrutivas são muito difíceis de serem tratadas. Os esforços terapêuticos baseiam-se em exercícios de relaxamento, autocontrole frente às situações estressantes e eletrochoque (OLSON & HOULIHAN, 2000). Técnicas de reforço positivo para situações onde não exista comportamento automutilador também são utilizadas (BULL & LaVECCHIO, 1978, OLSON & HOULIHAN, 2000, DeANTONIO et al., 2002).

Do ponto de vista odontológico, pulpotomia seguida da remoção das coroas dentárias (LEE et al., 2002), aliado ao uso de protetores bucais resinosos têm sido indicados a fim de evitar a perda tecidual provocados pela automutilação (CUSUMANO et al., 2001, ROBEY et al., 2003, FARDI et al., 2003).

#### **1.4. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase (ATP fosfoidrolase, EC 3.6.1.3).**

##### **1.4.1. Histórico**

As primeiras evidências da presença de uma bomba capaz de translocar Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> através da membrana celular foram introduzidas por Dean em 1941 (DEAN, 1941). Estudos realizados em membrana de eritrócitos, na década de 60, demonstraram que o efluxo de Na<sup>+</sup> era dependente das concentrações extracelulares de K<sup>+</sup>, sugerindo uma correlação entre o transporte ativo de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> (KEYNES, 1974, GLYNN, 1993). Concomitantemente, demonstrou-se que o transporte de íons

$\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  através dessa bomba iônica era inibido por glicosídeos cardiotônicos, tais como ouabaína (SCHULL et al., 1985).

Em 1957, estudos indicaram que a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase possuía natureza protéica e estava ligada a membrana plasmática (SKOU & ESMANN, 1992). Entretanto a identidade molecular dessa proteína somente foi demonstrada, em 1977, através de experimentos realizados em lipossomas (BOLDYREV, 1985).

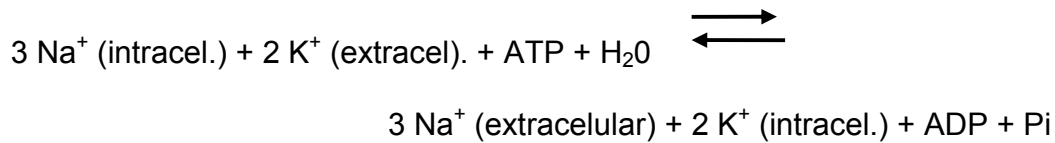
A brilhante descoberta da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase e de seu papel de vital na manutenção da viabilidade celular culminou com a condecoração através do Prêmio Nobel em Química, em 1997, entregue a Jeans C. Skou.

#### **1.4.2. Conceito, Função e Estrutura.**

A bomba de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  é uma proteína integral de membrana, a qual é essencial para o funcionamento normal de todas as células dos mamíferos. Esta enzima é responsável pelo transporte ativo dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  através da membrana plasmática, utilizando a energia proveniente da hidrólise da ligação do fosfato terminal do ATP (KAPLAN, 2002).

A estequiometria da reação pode ser representada da seguinte forma:





Três cargas positivas são transportadas para o meio extracelular enquanto apenas duas são transportadas para o meio intracelular. Sendo assim, o trabalho realizado configura-se como antiporte eletrogênico, produzindo um gradiente eletroquímico através da membrana (LINGREL & KUNTZWEILER, 1994).

Um grande número de funções celulares está acoplado a manutenção das concentrações intracelulares e extracelulares de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  tais como controle do volume celular, excitabilidade neuronal, atividade de enzimas citosólicas, contração muscular, além de auxiliar no movimento de outros íons e nutrientes através da membrana (VASILETS & SHWARZ, 1993, BERTORELLO & KARTZ, 1995).

A hidrólise do ATP ativada por íons é característica dos membros da classe das ATPases tipo-P, na qual estão contidas a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase,  $\text{H}^+$ -ATPase e  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (KAPLAN et al. 2002, JORGENSEN et al., 2003). Esta família de transportadores também está envolvida na homeostase iônica (HASLER et al, 2001). Entretanto, somente a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase é inibida por glicosídeos cardiotônicos.

A regulação da atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase é um processo complexo que requer diferentes níveis de regulação, classificados em mecanismos de “curta duração”, a qual envolve a ação de efetores na enzima presente na membrana

plasmática, e mecanismos de “longa duração”, os quais provocam alterações nas taxas de síntese e/ou degradação enzimática (BERTORELLO & KATZ, 1995, CORNELIUS & MAHMMOUD, 2003). Atualmente, estudos têm sido realizados para elucidar a regulação da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase através de proteínas presentes nas membranas celulares denominadas “fixit”, as quais são pequenas proteínas hidrofóbicas inseridas na membrana plasmática e que, através da interação com o complexo  $\alpha/\beta$  da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase, regulam a atividade dessa enzima (CRAMBERT et al., 2002).

Quanto a estrutura, a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase é um complexo enzimático formado por duas subunidades polipeptídicas principais ( $\alpha$  e  $\beta$ ), associadas covalentemente e incorporadas no interior da bicamada lipídica (SKOU & ESMANN, 1992). Trabalhos recentes têm demonstrado a presença de uma terceira subunidade ( $\gamma$ ), a qual está presente, predominantemente, no tecido renal (THERIEN et al., 1997, PU et al., 2002). A representação esquemática da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase está demonstrada na Figura 4.

A subunidade  $\alpha$  apresenta massa molecular de 112.000 Da e contém aproximadamente 1012 aminoácidos e a ela estão associadas as propriedades catalíticas e transportadoras enzimáticas, bem como o sítio de ligação para glicosídeos cardiotônicos e cátions (VASILETS & SCHWARZ, 1993). Esta subunidade é composta por três domínios citoplasmáticos: Domínio N (sítio de ligação para os

nucleotídeos), domínio P (sítio de fosforilação) e domínio A (sítio catalítico associado ao transporte de íons) (CORNELIUS & MAHMMOUD, 2003).

Até o presente momento, foram descobertas 4 isoformas da subunidade  $\alpha$ , denominadas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  e  $\alpha 4$ , distribuídas em diferentes proporções nos tecidos. A isoforma  $\alpha 1$  está amplamente distribuídas nas células,  $\alpha 2$  é predominante no músculo esquelético,  $\alpha 3$  no tecido nervoso central (HABIBA et al., 2000) e  $\alpha 4$  presente seletivamente nos testículos (BLANCO & MERCER, 2000).

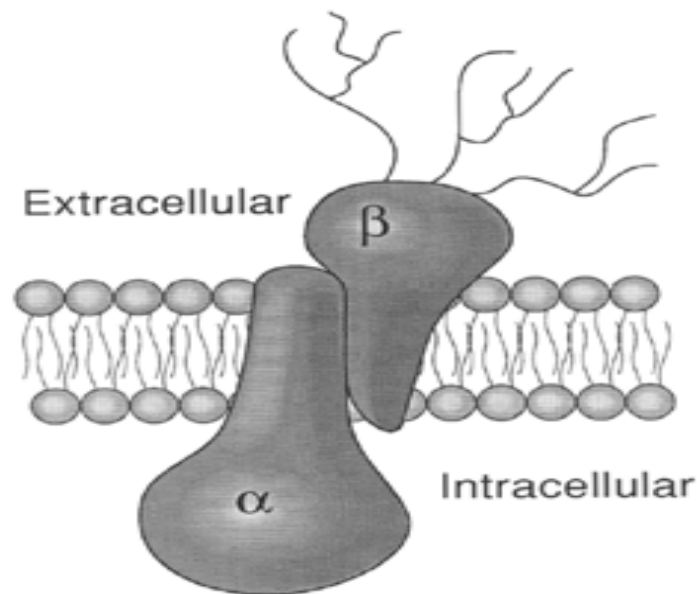


Figura 4: Representação Esquemática da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase inserida na bicamada lipídica da membrana plasmática.

A subunidade  $\beta$  apresenta massa molecular entre 40.000 e 60.000 Da e contém em torno de 300 aminoácidos. As três isoformas da subunidade  $\beta$  ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ) apresentam estruturas básicas compostas de uma região citoplasmática  $\text{NH}_2$ -

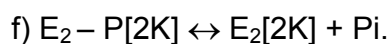
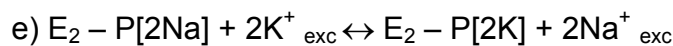
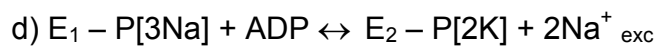
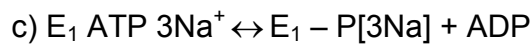
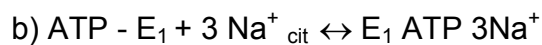
terminal, segmento transmembrana, um largo domínio extracelular e 3 pontes dissulfito (BLANCO & MERCER, 2000). Entretanto, estudos realizados em diferentes tecidos demonstram uma baixa homologia entre as isoformas da subunidade  $\beta$  (SWEADNER, 1991). Essa subunidade parece atuar como chaperonina específica, favorecendo a correta inserção do complexo  $\alpha\beta$  na membrana plasmática, além de aumentar a resistência contra proteólise e degradação celular das subunidades  $\alpha$  recém sintetizadas (HASLER et al, 2001). A sensibilidade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase aos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  é dependente da isoforma da subunidade  $\beta$ , devido a sua interferência na ativação enzimática desencadeada pela presença extracelular do íon  $\text{K}^+$  (LOPINA, 2001).

Evidências sugerem que a redução nas ligações dissulfito presentes na subunidade  $\beta$  provoca uma diminuição na atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase (SWEADNER, 1991). Além disso, no sistema nervoso, a subunidade  $\beta$  parece estar relacionada com a adesão celular (GLOOR et al., 1990).

A subunidade  $\gamma$  é um peptídeo com massa molecular de 7.4 kDa, o qual está ligada a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase em algumas regiões do nefron (LOPINA, 2001). Estudos demonstraram que a adição subunidade  $\gamma$  presente na enzima altera sua afinidade por cátions monovalentes, indicando que essa subunidade tem uma função moduladora sobre enzima (ARYSTARKHOVA et al., 1999). Entretanto sua presença parece não ser essencial para a função enzimática (THERIEN et al., 1997).

### **1.4. 3. Mecanismo de Ação.**

Os alicerces para o entendimento dos mecanismos de ação da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase foram embasados em estudos sobre os mecanismos de transporte de cátions, propriedades bioquímicas dos metabólitos intermediários da fosfoenzimas e mudanças conformacionais em proteína dependentes da fosforilação enzimática (KAPLAN, 2002, JORGENSEN et al., 2003). As reações enzimáticas, baseadas nos mecanismos de Albert – Post, envolvem os seguintes passos (adaptado de JORGENSEN et al., 2003):

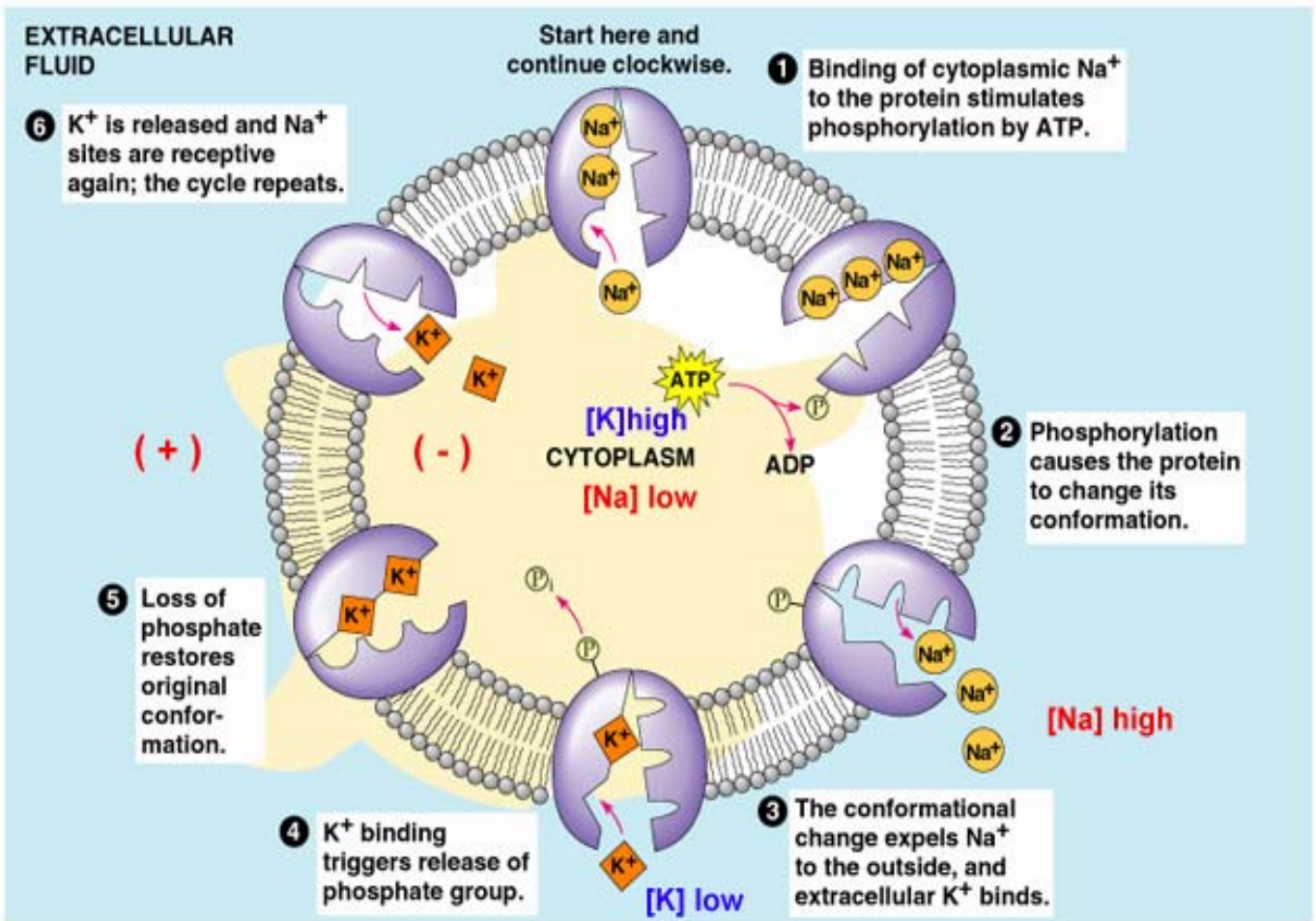


Ao fim dessa seqüência de reações, em condições normais de funcionamento, a enzima transporta 3 íons sódio para o meio extracelular e 2 íons potássio para o meio intracelular para cada molécula de ATP hidrolisada (GLYNN, 1993).

O mecanismo de reação é dependente de dois estados conformacionais dependentes de fosforilação. Estado conformacional  $E_2$ , forma fosforilada, com alta afinidade por  $\text{K}^+$  e baixa afinidade por  $\text{Na}^+$  e estado conformacional  $E_1$ , forma

desfosforilada, com alta afinidade por  $\text{Na}^+$  e baixa afinidade por  $\text{K}^+$  (GLYNN, 1993). Inicialmente,  $\text{K}^+$  é liberado na porção intracelular, acompanhado de mudança conformacional  $\text{E}_2$  para  $\text{E}_1$ . Ocorre a ligação de 3 íons  $\text{Na}^+$  em um sítio de alta afinidade para o  $\text{Na}^+$  na porção citoplasmática da enzima. Nesse momento, ocorre a ligação do ATP em seu sítio de ligação e conseqüente fosforilação, aliada a mudança conformacional enzimática. A fosforilação facilita a oclusão dos 3 íons  $\text{Na}^+$  na molécula da enzima e seu transporte para o meio extracelular.

Após a liberação dos íons  $\text{Na}^+$ , há mudança do estado conformacional  $\text{E}_1$  para  $\text{E}_2$ . O íon  $\text{K}^+$  se liga em um sítio na porção extracelular e esta ligação transfere o grupo fosfato liberado para a água (formando o fosfato inorgânico). A enzima é desfosforilada, liberando o íon  $\text{K}^+$  na porção intracelular, dando reinício ao ciclo (JORGENSEN et al., 2003). O mecanismo de ação da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase está esquematizado na figura 5.



©1999 Addison Wesley Longman, Inc.

Figura 5: Mecanismo de ação da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase.

#### **1.4.4. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase e Sistema Nervoso Central.**

A Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase é a enzima responsável pelo transporte ativo de sódio e potássio no sistema nervoso central, necessário para a manutenção do gradiente iônico e excitabilidade neuronal (ERICINSKA & SILVER, 1994), assim como para a diferenciação e a sobrevivência celular (YU, 2003). Ela está presente em grandes quantidades nos neurônios (BOLDYREV, 1985), assim como nas células gliais (KWON et al., 2003). Esta enzima consome 40 – 50% do ATP formado no cérebro e sua atividade está relacionada com a fluidez de membrana (ERICINSKA & SILVER, 1975).

Estudos na literatura demonstram uma significativa inibição na atividade da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase causada por glicosídeos carditônicos tais como a digoxina e ouabaína (LINGREL & KUNTZWEILER, 1994). Evidências também demonstram que a prolongada inibição dessa enzima causada pela ouabaína favorece a morte celular (CAPELLA et al., 2001). Neste contexto, Lees e colaboradores (1993) demonstraram que altas doses de ouabaína (1mM), quando injetadas intracerebralmente, produzem necrose celular, enquanto baixas doses de ouabaína (0,1 mM) provocam danos neurônio-seletivos. Todavia, concentrações de ouabaína ao redor de 0,1 µM não são capazes de afetar a homeostase do íon K<sup>+</sup> e a viabilidade celular (XIAO et al., 2002 b).



Atualmente, uma nova família de inibidores endógenos da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase, sintetizada a partir de esteróides produzidos na glândula pineal está sendo alvo de estudo. Entretanto, ainda não está elucidado sua ação sobre as diferentes isoformas da enzima e a ação desses compostos sobre a atividade enzimática cerebral (LINCHTSEIN & ROSEN, 2001).

A inibição da atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase está relacionada a diversas patologias do sistema nervoso central tais como isquemia cerebral (WYSE et al., 2000), epilepsia (GRISAR, 1984), Parkinson (KUMAR & KURUP, 2002) e em outras doenças neurodegenerativas (LEES, 1993). Renkawek e colaboradores (1992) demonstraram que uma redução de 40% na atividade enzimática em córtex cerebral de ratos neonatos está envolvida em processos convulsivantes e encefalopatia espongiiforme. Além disso, outros estudos demonstraram que a inibição da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase na presença de um insulto celular não letal, ativa a cascata apoptótica injúria neuronal, provavelmente pela alteração na homeostase do íon  $\text{K}^+$  (WANG et al., 2003).

O efeito inibitório de radicais livres sobre a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase tem sido relacionada com o dano neuronal (DOBROTA et al., 1999). Evidências na literatura demonstraram que 4-hidroxinonenal, produzido durante a peroxidação das membranas celulares, liga-se aos grupamentos sulfidríla da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase provocando diminuição na atividade enzimática (SIEMS et al., 1996; MARK et al., 1997).

Adicionalmente, a inibição da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase induz a liberação de neurotransmissores, dentre eles o glutamato, o qual está envolvido na morte neuronal (WESTERINK et al, 1990). Stelmashook e colaboradores (1999) demonstraram que a diminuição na atividade enzimática em cultura de células neurogliais de cerebelo acarreta o acúmulo de glutamato, hiper-estimulação de receptores glutamatérgicos e o aumento do influxo dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$ , provocando dano celular.

Estudos in vitro e in vivo têm demonstrado que alguns aminoácidos inibem a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase em membrana plasmática sináptica cerebral (WYSE et al., 1995, SILVA et al., 1999, PONTES et al., 1999, STRECK et al., 2002a, ZUGNO et al., 2003, FRANZON et al., 2003). Wyse e colaboradores demonstraram que a hiperfenilalaninemia experimental crônica reduz a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase. A administração de homocisteína (STRECK et al., 2002 a) e prolina (PONTES et al, 1999) também inibem a atividade dessa enzima. Adicionalmente, estudos mostraram que o guanidinoacetato e outros compostos guanidínicos in vitro inibem a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase em estriado de ratos (SILVA et al., 1999, ZUGNO et al., 2003).

## 1.5. OBJETIVOS

Partindo da observação que: a) a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase é uma enzima crucial para o funcionamento normal do sistema nervoso central; b) os pacientes portadores da Lesch-Nyhan apresentam disfunções neurológicas e uma diminuição nos níveis de dopamina similares àqueles encontrados em pacientes com a doença de Parkinson; d)  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase está diminuída em cérebro de pacientes com a doença de Parkinson; e) evidências na literatura mostram que as oxipurinas, em concentrações semelhantes às encontradas em pacientes com Lesch-Nyhan, possuem efeitos neurotóxicos; f) não há relatos na literatura relacionando substâncias acumuladas na Lesch-Nyhan e a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, cremos ser importante investigar o efeito *in vitro* de substâncias acumuladas na Lesch Nyhan sobre a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase em estriado de ratos neonatos. Portanto, o presente trabalho tem como objetivos:

1. Verificar o efeito *in vitro* das substâncias acumuladas na Lesch-Nyhan, hipoxantina, xantina e ácido úrico, sobre a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase de membrana plasmática sináptica em estriado de ratos neonatos.

2. Verificar o efeito da preincubação com hipoxantina em homogeneizado de estriado de ratos neonatos sobre a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase de membrana plasmática sináptica na presença ou ausência de antioxidantes.

## 2.0 ARTIGOS

### *Artigo 1*

#### **Inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity in rat striatum by the metabolites accumulated in Lesch-Nyhan disease**

Caren S. Bavaresco, Alexandra I. Zugno, Barbara Tagliari, Clóvis M.D. Wannmacher, Moacir Wajner and Angela T.S. Wyse

Aceito para publicação na revista International Journal of Developmental Neuroscience, 2003.

### *Artigo 2*

#### **Inhibition of striatal Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity caused by hypoxanthine is probably mediated by oxidative stress**

Caren S. Bavaresco, Renata Franzon, Cristiane Matté, Clóvis M.D. Wannmacher, Moacir Wajner and Angela T.S. Wyse

Submetido para publicação na revista Neuroscience Research

*Artigo 1*

**Inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity in rat striatum by the metabolites accumulated in Lesch-Nyhan disease**

Caren S. Bavaresco, Alexandra I. Zugno, Barbara Tagliari, Clóvis M.D. Wannmacher, Moacir Wajner and Angela T.S. Wyse

Aceito para publicação na revista International Journal of Developmental Neuroscience, 2003.

**Inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity in rat striatum by the metabolites  
accumulated in Lesch-Nyhan disease**

Caren S. Bavaresco, Alexandra I. Zugno, Barbara Tagliari, Clóvis M.D. Wannmacher,

Moacir Wajner and Angela T.S. Wyse

Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

Porto Alegre, RS, Brazil

Reprint request to: Angela T.S. Wyse

Departamento de Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo

CEP 90035 – 003 Porto Alegre RS Brazil

Phone 55 51 3316 5573 Fax 55 51 3316 5535

E-mail: [wyse@ufrgs.br](mailto:wyse@ufrgs.br)

## **Abstract**

In the present study we investigated the *in vitro* effect of hypoxanthine, xanthine, and uric acid, metabolites accumulating in tissue of patients with Lesch-Nyhan disease, on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in striatum of neonate rats. Results showed that all compounds significantly inhibited Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity. We also studied the kinetics of the inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity caused by hypoxanthine. The apparent K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity for ATP as the substrate and hypoxanthine as the inhibitor were 0.97 mM and 0.69 nmol inorganic phosphate (Pi) released per min per mg of protein, respectively. K<sub>i</sub> value was 1.9 μM, and the inhibition was of the non-competitive type. We also observed that the inhibitory effects of hypoxanthine, xanthine and uric acid probably occur through the same mechanism, suggesting a common binding site for these oxypurines on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Therefore, it is conceivable that inhibition of brain Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity may be involved at least in part in the neuronal dysfunction characteristic of patients with Lesch-Nyhan disease.

**Key Words:** Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase; Lesch-Nyhan; hypoxanthine; xanthine; uric acid; striatum.



## 1. Introduction

Lesch-Nyhan disease is an inherited metabolic disorder of purine metabolism caused by a severe deficiency on hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) activity, resulting in tissue accumulation of hypoxanthine, xanthine and uric acid. This enzyme recycles hypoxanthine and guanine into inosine monophosphate (IMP) and guanine monophosphate (GMP), respectively (Fig. 1). It has been demonstrated that the highly expressed HPRT activity, particularly the basal ganglia, is important to the purine salvage pathway in order to maintain adequate purine levels (Visser et al., 2000; Jinnah and Friedmann, 2001). In most tissues, hypoxanthine, the major metabolite accumulated in Lesch-Nyhan disease, is predominantly degraded to xanthine and uric acid (Visser et al., 2000).

Affected patients with Lesch-Nyhan disease present hyperuricemia, spasticity, dystonia, mental retardation and a self-mutilation behavior, which is characterized by biting of the lips, tongue and fingers with apparent tissue loss (Jinnah et al., 1990). Alteration of the dopamine transmitter system in basal ganglia of these patients is also observed (Jinnah and Friedmann, 2001).

Although the underlying mechanisms of brain dysfunction in Lesch-Nyhan disease are poorly understood, the accumulation of oxypurines is believed to contribute to the neurological damage characteristic of this disease. In this context, it has been demonstrated that hypoxanthine and xanthine bind to brain benzodiazapinic receptors, interfering with their normal function (Ticku and Burch, 1980). In addition, Palmour and colleagues (1989) showed that hypoxanthine provokes dopamine depletion in cultured neuronal cells. Interestingly, high levels of hypoxanthine are found in some neuropathologies, including hydrocephalus (Schmidt et al., 1995) and cerebral ischemia (Hagberg et al., 1987). Furthermore, brain edema, probably mediated by oxidative stress, can be elicited by exposing the CNS to xanthine and xanthine oxidase (Chan and colleagues, 1984). On the other hand, it has been proposed that xanthine derivatives, such as methylxanthines, induce seizures in rat (Cutrufo et al., 1992; Mares et al., 1994).

**Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase ( EC 3.6.1.37) is an enzyme embedded in the cell membrane, responsible for the generation of the membrane potential through the active transport of sodium and potassium ions in the CNS necessary to maintain neuronal excitability. It is present at high concentrations in brain and consumes 40 – 50% of the ATP generated in this tissue (Erecinska and Silver, 1994). Reduced activity of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is found in cerebral ischemia (Wyse et al., 2000), in epilepsy (Grisar, 1984) and in various neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease (Lees, 1993; Hattori et al., 1998; Kumar and Kump, 2002). Additionally, it has been reported that Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity is decreased in the erythrocyte membrane of patients with uraemia (Sigstrom, 1981; Vasarhelyi et al., 1996) and rheumatoid arthritis (Testa et al., 1987).**

In the present study, we investigated the *in vitro* effect of hypoxanthine, xanthine and uric acid on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity in synaptic plasma membrane from rat striatum in order to clarify the etiopathogenic mechanisms of brain damage of Lesch-Nyhan patients. We also study the kinetics of the inhibition caused by hypoxanthine on the enzyme and the interaction between hypoxanthine, xanthine and uric acid. Striatum was used because patients with Lesch-Nyhan syndrome present alterations in the basal ganglia (Jinnah and Friedmann, 2001).

## **2. Experimental Procedure**

### *2.1. Animals and reagents*

Six-day-old rats were obtained from the Central Animal House of Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. Animals were maintained on 12h /12h light/dark cycle (lights on from 7 a.m. to 7 p.m.) in air-conditioned constant temperature (22° C) colony room, and had free access to a 20% (w/w) protein commercial chow and water. Animal care followed the official governmental guidelines in compliance with the Federation of Brazilian Society for Experimental Biology and was approved by ethics committee of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

## *2.2. Preparation of synaptic plasma membrane of striatum*

Synaptic plasma membranes were prepared according to the method of Jones and Matus (1974), with some modifications (Wyse et al., 1995). Rats were killed by decapitation without anesthesia, the brain was immediately separated and the striatum was dissected and homogenized in 10 volumes of a 0.32 M sucrose solution containing 5 mM HEPES and 1 mM EDTA. The homogenate was centrifuged at 1,000 x g for 20 min and the supernatant removed and centrifuged at 12,000 x g for a further 20 min. The pellet was then resuspended in hypotonic buffer (5.0 mM Tris-HCl buffer, pH 8.1), incubated at 0°C for 30 min, and applied on a discontinuous sucrose density gradient consisting of successive layers of 0.3, 0.8 and 1.0 M. After centrifugation at 69,000 x g for 2 h, the fraction at the 0.8–1.0 M sucrose interface was taken as the membrane enzyme preparation.

## *2.3. Determination of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity*

The reaction mixture for the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase assay contained 5.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 80.0 mM NaCl, 20.0 mM KCl, and 40.0 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, in a final volume of 200 μL. The reaction was started by the addition of ATP (disodium salt, vanadium free) to a final concentration of 3.0 mM. Controls were assayed under the same conditions with the addition of 1.0 mM ouabain. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity was calculated by the difference between the two assays (Tsakiris and Deliconstantinos, 1984). Released inorganic phosphate (Pi) was measured by the method of Chan and colleagues (1986). Specific enzyme activity was expressed as nmol Pi released per min per mg of protein. Hypoxanthine, xanthine and uric acid were dissolved in Tris-HCl buffer, pH 7.4 on the same day of the experiments. The concentrations of the oxypurines supplemented to the incubation medium were similar to those found in plasma of Lesch-Nyhan patients (Puig et al., 1989).

#### *2.4. Protein determination*

Protein was measured by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumine as standard.

#### *2.5. Statistical analysis*

All assays were performed in duplicate and the mean was used for the statistical calculations. Data were analyzed by one way analysis of variance (ANOVA) followed by the Duncan multiple range test when the F test was significant. Linear regression was used to check for dose-dependent effects. All analyses were performed using the Statistical

Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer. Significance was achieved when  $p < 0.05$ .

### 3. Results

Fig. 2 displays the *in vitro* effect of hypoxanthine on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase activity in synaptic plasma membrane from striatum of neonate rats. It can be seen that hypoxanthine significantly inhibited  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase activity [ $F(4,15)= 33.37$ ;  $p < 0.001$ ], in a dose-dependent manner [ $F=46.81$ ,  $\beta = - 0.850$ ;  $p < 0.001$ ], with maximal inhibition (80%) occurring at 10  $\mu\text{M}$ . Similarly, xanthine inhibited  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase activity [ $F(4,15)= 39.42$ ;  $p < 0.001$ ] in a dose-dependent manner [ $F=72.45$ ,  $\beta = - 0.89$ ;  $p < 0.001$ ], with maximal inhibition (82%) observed at 2.5  $\mu\text{M}$  (Fig. 3). Finally, an inhibitory effect was seen for uric acid, which provoked a decrease of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase activity [ $F(4,15)=25.33$ ;  $p < 0.001$ ] with maximal inhibition (64%) occurring at 0.7 mM (Fig. 4). Regression analysis also indicated that uric acid inhibited the enzyme in a dose-dependent manner [ $F=40.59$ ,  $\beta = - 0.83$ ;  $p < 0.001$ ].

Furthermore, we also tested whether hypoxanthine, xanthine and uric acid might be acting on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase through the same mechanism. Kinetic studies on the interaction of the three oxypurines on the enzyme activity were carried out according to an adaptation (Wyse et al., 1995) of the model described by Chevillard et al. (1993). The horizontal straight line obtained in the resulting competition plot, i.e. a constant rate independent of the proportions between hypoxanthine and xanthine, hypoxanthine and uric acid and xanthine and uric acid concentrations, indicates that

the inhibitory effects of hypoxanthine, xanthine and uric acid occur through the same mechanism (Fig. 5).

We also performed kinetic studies on the *in vitro* inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity by hypoxanthine (Fig. 6). The Lineweaver-Burk double-reciprocal plot was analyzed over the range of 0.05 – 0.4 mM ATP concentrations in the absence and the presence of 7.0 or 10 μM of hypoxanthine. Results indicated that the inhibition of this enzyme caused by hypoxanthine was of the non-competitive type, because maximal ATPase velocity decreased with increasing hypoxanthine concentrations while the K<sub>m</sub> value remained the same. Apparent K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity for ATP as the substrate were 0.97mM and 0.69 nmol Pi released per min per mg protein, respectively. The K<sub>i</sub> value (inhibition constant) obtained from Dixon plots was 1.9 μM (data not shown).

#### **4. Discussion**

Lesch-Nyhan disease is an X-linked recessive disease of purine metabolism biochemically characterized by deficiency of HPRT activity, resulting in tissue accumulation of hypoxanthine, xanthine and uric acid. Affected patients present neurological and cognitive disability, choreoatetosis, spasticity, mental retardation and a peculiar neurobehavioral phenotype characterized by compulsive self-mutilation (Lyhan, 1997; Jinnah and Friedmann, 2001).

Although the mechanisms of brain damage in Lesch-Nyhan disease are poorly defined, it has been proposed that striatal dopaminergic neuronal loss, ATP

deficiency, excitotoxicity and oxidative stress induction could be involved in the brain damage of this disorder (Sivam, 1996; Saito and Takashima, 2000; Visser et al., 2000; Jinnah and Friedman, 2001). There are various studies showing that the accumulated metabolites hypoxanthine, xanthine and uric acid contribute decisively to the neuropathogenesis of this disease (Palmour et al., 1989; Ma et al., 2001; Jinnah and Friedmann, 2001; Weir et al., 2003). In this context, it has been shown that hypoxanthine accumulation provokes dopamine depletion in cultured neuronal cells (Palmour et al., 1989) and impairs morphogenesis and increases proliferation of a neuroblastoma model of Lesch-Nyhan syndrome (Ma et al., 2001). Additionally, other studies suggested that elevated levels of xanthine in Lesch-Nyhan patients could initiate a chain of events that produce excessive endogenous convulsants and decreases the endogenous anticonvulsants, resulting in self-injurious movements (Geyde, 1992). Finally, other investigators suggested that the accumulation of hypoxanthine and xanthine in Lesch-Nyhan disease potentially result in tissue damage caused by oxygen free radicals generated through the enzyme xanthine oxidase (Parks and Granger, 1986).

On the other hand, neuroprotective or neurotoxic effects of these substances, especially uric acid, have also been described. In this context, it is believed that, because of its antioxidant properties, uric acid may play a neuroprotective role in the human brain (Ames et al., 1981; Church and Ward, 1994; Becker and Roessler, 1995). Accordingly, it has been shown that uric acid prevents the neurotoxicity elicited by ischemia in cultured neuronal cells (Yu et al., 1998). Other investigators suggested that the increased uric acid levels in tissue of patients with Lesch-Nyhan disease

might be toxic to the developing nervous system (Nyhan et al., 1965; Berman et al., 1969; Henderson, 1968). In this respect, uric acid may become pro-oxidant in situations when concentrations of antioxidants such as ascorbate are decreased (Weir et al., 2003). Furthermore, the neurobehavioral abnormalities found in HPRT-deficient mouse can be prevented by the enzyme uricase, indicating a neurotoxic effect of uric acid (Wu et al., 1994). It should be stressed that, nevertheless the neurotoxic or neuroprotective effects attributed to uric acid, the concentrations of this compound in CSF of Lesch-Nyhan patients are normal or only slightly increased, implying that this metabolite probably does not exert an important role in the neuropathology of this disease (Rijksen et al., 1981; Rosembloom et al., 1967; Visser et al., 2000).

Since maintenance of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase is critical for normal brain function and reduction of this activity is related to selective neuron damage in the rat brain (Ben Ari, 1985; Choi and Rothman, 1990; Lees, 1993), the aim of the present study was to investigate the *in vitro* effect of hypoxanthine, xanthine and uric acid on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase activity in rat striatum. We used this cerebral structure because basal ganglia lesions are characteristic of Lesch-Nyhan disease (Jinnah and Friedmann, 2001). We firstly observed that concentrations of these compounds similar to those found in plasma of Lesch Nyhan patients significantly inhibit  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase activity by up to 80, 82 and 64%, respectively. The kinetics of the inhibition caused by hypoxanthine and the interaction between hypoxanthine, xanthine and uric acid on  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase activity showed that hypoxanthine inhibits this activity in a non-competitive manner with ATP. Furthermore, we also observed that hypoxanthine, xanthine and uric acid



probably bind Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase on the same site of the enzyme, suggesting a similar mechanism of action for these purines.

There is good evidence in the literature suggesting that inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity leads to neuronal death (Wang et al, 2003) and is related to many pathological conditions in the CNS (Lees, 1993; Hattori et al.,1998; Kumar and Kurup, 2002). In this context, it has been demonstrated that neuronal death associated with a decrease in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity is mediated via intracellular depletion of K<sup>+</sup> and accumulation of Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> (Xiao et al., 2002). Furthermore, Renkawek and colleagues (1992) associated a 40% reduction of this enzyme activity in brain of a neonate with its status convulsivus and spongiform encephalopathy.

Furthermore, decreased Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity has been associated with excitotoxicity. Thus, it has been demonstrated that striatal neurons are more vulnerable to glutamate neurotoxicity when this enzyme activity is reduced (Calabresi et al., 1995). Furthermore, when Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity is impaired, Na<sup>+</sup> concentration increased intracellularly, collaborating to the pathological mechanisms involved in cerebral edema (Kempisi, 2001). In agreement with these findings, other studies indicated that Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase inhibition, in the presence of a non-lethal insult, activates the apoptotic cascade and neuronal injury probably by amplifying the disruption on K<sup>+</sup> homeostasis (Wang et al., 2003).

We have previously demonstrated in vitro and in vivo that various metabolites accumulating in various inherited metabolic disorders whose phenotype is basically characterized by neurological dysfunction inhibit this enzyme activity (Wyse et al., 1995, Silva et al. 1999; Pontes et al., 1999; Pontes et al., 2001; Streck et al., 2001;

Streck et al., 2002; Wyse et al., 1998; Wyse et al., 2000; Wyse et al., 2001; Zugno et al., 2003). It is well established that some of these compounds are inhibitors of mitochondrial energy metabolism, whereas others elicit free radical production (Streck et al., 2003a; Streck et al., 2003b; Streck et al., 2003c; Delwing et al., 2003; Delwing et al., 2003). Considering that  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase consumes approximately 50 % of ATP generated in CNS, it may be presumed that ATP decrease can indirectly inactivate this activity. On the other hand, since this enzyme activity is highly susceptible to free radicals (Lees, 1993), it may occur that the inhibitory activity of some metabolites may well be via free radical generation. Finally, it is also conceivable that some substances can directly bind to the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase due to their specific chemical structures modulating its activity or alter the synaptic membrane where the enzyme is embedded, as occurs for other substances which inhibit  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Carfagna and Muhaberac, **ano**). In what concerns to the present *in vitro* results, although the underlying mechanisms of inhibition are unknown and further experiments are needed to clarify this aspect, it is possible that the oxypurines directly interacted with the enzyme or altered the synaptic membrane in which the enzyme is embedded since incubation was carried out in the presence of excess ATP and purified synaptic membrane preparations were used in the assays so that production of free radicals under these conditions is unlikely. An oxidation of essential groups of the enzyme by the metabolites cannot be however ruled out.

In conclusion, the present results showed that hypoxanthine, xanthine and uric acid provoke a significant *in vitro* inhibition of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  - ATPase activity in rat striatum. Considering that  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  - ATPase activity impairment is involved in common neurotoxicity events, in case our results can be extrapolated to the human condition,

it may be presumed that reduction of brain Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity by accumulated purines may contribute to clarify the mechanisms of the severe neurological dysfunction of Lesch-Nyhan patients.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from CNPq - Brazil, FAPERGS, RS – Brazil and Programa de Núcleos de Excelência ee Estudos e Projetos (PRONEX II – FINEP – Brazil).

### **References**

- Ames, B.N., Cathcart, R., Schwiers, E., Hochstein, P. 1981. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:6858-6862.
- Becker, M.A., and Roessler, B.J. 1995. Pages 1192-1202, In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (eds), *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, McGraw-Hill, Inc., 8<sup>th</sup> Ed, New York
- Ben-Ari, Y., 1985. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neurosci.* 14, 375-403.

- Berman, P.H., Balis, M.E., Dancis, J. 1969. Congenital hyperuricemia: an inborn error of purine metabolism associated with psychomotor retardation, athetosis, and self-mutilation. *Arch. Neurol.* 20:44-53.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein –die binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Calabresi, P., De Murtas, M., Pisani, A., Stefani, A., Sancassario, G., Mercuri, N.B., Bernardi, G., 1995. Vulnerability of medium spiny striatal neurons to glutamate: role of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. *Eur. J. Neurosci.* 7, 1674-1683.
- Carfagna, M.A. & Muhoberac, B.B., 1993. Interactions of tricyclic drug analogs with synaptic plasma membranes: structure-mechanism relationships in inhibition of neuronal Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity. *Mol. Pharmacol.* 44, 129-141.
- Chan, K.M., Delfert, D., Junger, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for Ca<sup>+</sup> - stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157, 375-380.
- Chan, P.H., Schmidley, J.W., Fishman, R.A., Longar, S.M., 1984. Brain injury, edema and vascular permeability changes induced by oxygen derived free radicals. *Neurology.* 34, 315-320.
- 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.

- Church, W.H., and Ward, V.L. 1999. Uric acid is reduced in the substantia nigra in Parkinson's disease: effect on dopamine oxidation. *Brain. Res. Bull.* 33:419-424.
- Cutrufo, C., Bortot, L., Gianchetti, A., Manzini, S., 1992. Differential effects of various xanthines on pentyletetrazole-induced seizures in rats: an EEG and behavioral study. *Eur. J. Pharmacol.* 3, 1-6.
- Delwing, D., Bavaresco, C.S., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T.S., 2003. Proline induces oxidative stress in cerebral cortex of rats. *Int. J. Devl. Neurosci.* 21, 105-110.
- Delwing, D., Tagliari, B., Streck, E.L., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., Wyse, A.T.S., 2003. Reduction of energy metabolism in rat hippocampus by arginine administration. *Brain. Res.* 983, 58-63.
- Erecinska, M., Silver, I.A., 1994. Ions and energy in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 7, 21-29.
- Geyde, A., 1992. Serotonin-gaba treatment is hypothesized for self-injury in Lesch-Nyhan syndrome. *Med. Hypoth.* 38, 325-328.
- Grisar, T., 1984. Glial and neuronal Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-pump in epilepsy. *Ann. Neurol.* 16 (Suppl.), 128-134.
- Hagberg, H., Andersson, P., Lacarewicz, J., Jacobson I., Butcher, S., Sandberg, M., 1987. Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine and xanthine to tissue nucleotides and purines in rat striatum during transient ischemia. *J. Neurochem.* 49, 227-231.

- Hattori, N., Kitagawa, K., Higashida, T., Yagyu, K., Shimohama, S., Wataya, T., Perry, G., Smith, M.A., Inagaki, C. 1998.  $\text{Cl}^-$  - ATPase and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase activities in Alzheimer's disease brains. *Neurosci. Lett.* 254:141-144.
- Herderson, J.F. 1968. Possible functions of hypoxanthine – guanine phosphoribosyltransferase and their relation to the biochemical pathology of the Lesch-Nyhan syndrome. *Fed. Proc.* 2:302-304.
- Jinnah, H.A. & Friedmann, T., 2001. Lesch Nyhan disease and its variants. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds). *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, McGraw-Hill, 8 ed., New York, pp. 2537-2569.
- Jinnah, H.A., Gage, F.H., Friedmann, T., 1990. Animal models of Lesch-Nyhan syndrome. *Brain. Res. Bull.* 25, 467-475.
- Jones, D.H., Matus, A.I., 1974. Isolation of synaptic plasma membrane from brain by combined flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim. Biophys. Acta.* 356, 276-287.
- Kempski, O., 2001. Cerebral edema. *Semin. Nephrol.* 21, 303-307.
- Kumar, A.R., Kurup, P.A., 2002. Inhibition of a membrane  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase activity: a common pathway in central nervous system disorder. *J. Assoc. Physicians. India.* 50, 400-406.
- Lees, G.J., 1993. Contributory mechanism in the causation of neurodegenerative disorders. *Neurosci.* 54, 287-322.
- Nyhan, W.L., 1997. The recognition of Lesch-Nyhan syndrome as an inborn error of purine metabolism. *J. Inher. Metab. Dis.* 20, 171-178.

- Ma, M.H.Y., Stacey, N.C., Connolly, G.P., 2001. Hypoxanthine impairs morphogenesis and enhances proliferation of a neuroblastoma model of Lesch Nyhan syndrome. *J. Neurosci. Res.* 63, 500-508.
- Mares, P., Kubova, H., Czuczwar, S.J., 1994. Aminophylline exhibits convulsant action in rats during ontogenesis. *Brain. Dev.* 16, 296-300.
- Nomikos, G.G., Zis, A.P., Damsma, G., Fibiger, H.C., 1994. Electroconvulsive shock increases interstitial concentrations of uric acid in the rat brain. *Brain. Res.* 10, 50-56.
- Nyhan, W.L., Oliver, W.J., Lesch, M. 1965. A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function II. *J. Pediatr.* 67:439-444.
- Palmour, R.M., Heshka, T.W., Ervin, F.R., 1989. Hypoxanthine accumulation and dopamine depletion in Lesch-Nyhan disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 253, 165-172.
- Parks, D.A., Granger, D.N., 1986. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta. Physiol. Scand.* 548, 87-99.
- Pontes, Z.L., Oliveira, L.S., Bavaresco, C.S., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., Wannmacher, C.M.D., Wyse, A.T.S., 1999. Proline administration decreases  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in the synaptic plasma membrane from cerebral cortex of rats. *Metab. Brain. Res.* 26, 1321-1326.
- Pontes, Z.L., Oliveira, L.S., Franzon, R., Wajner, M., Wannmacher, C.M., Wyse, A.T.S., 2001. Inhibition of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity from rat hippocampus by proline. *Merochem. Res.* 26, 1321-1326.

- Puig, J.G., Jimenez, M.L., Mateos, F.A., Fox, I.H., 1989. Adenine nucleotide turnover in hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase: evidence for an increased contribution of purine biosyntheses de novo. *Metabolism*. 38, 410-418.
- Renkawek, K., Renier, W.O., De Pont, J.J., Voegels, O.J., Gabreels, F.J., 1992. Neonatal status convulsivus, spongiform encephalopathy and low activity of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the brain. *Epilepsy*. 33, 58-64.
- Rijksen, G., Staal, G.E.J., Van der Vlist, M.J.M., Beermer, F.A., Troost, J., Gutensohn, W., Van Laarhoven, J.P.R.M., De Bruyn, C.H.M.M. 1981. Partial hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase deficiency with full expression of the Lesch – Nyhan syndrome. *Hum. Gen.* 57:39-47.
- Rosenbloom, R.M., Henderson, J.F., Caldwell, I.C., Kelley, W.N., Seegmiller, J.E. 1967. Inherited disorder of purine metabolism. *JAMA*. 202:175-177.
- Saito, Y., and Takashima, S., 2000. Neurotransmitter changes in the pathophysiology of Lesch-Nyhan disease. *Brain. Dev.* 22, 122-131.
- Schmidt, H., Siems, W.G., Grune, T., Grauel, E.L., 1995. Concentration of purine compounds in the cerebrospinal fluid of infants suffering from sepsis, convulsions and hydrocephalus. *J. Perinat. Med.* 23, 167-174.
- Sigstrom, L., 1981. Characteristics of active sodium and potassium transport in erythrocytes in children with different stages of symptomatic uremia. *Acta. Paediatr. Scand.* 70, 361-368.
- Silva, C.G., Parolo, E., Streck, E.L., Wajner, M., Wannmacher, C.M., Wyse, A.T.S., 1999. In vitro inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity from rat cerebral cortex by guanidino compounds accumulating in hyperargininemia. *Brain. Res.* 838, 78-84.



- Sivam, S.P., 1996. Dopamine, serotonin and tachykinin in self-injurious behavior. *Life. Sci.* 14, 4839-4846.
- Streck, E.L., Zugno, A.I., Tagliari, B., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., Wyse, A.T.S., 2001. Inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity induced by homocysteine is probably mediated by oxidative stress. *Neurochem. Res.* 26, 1195-1200.
- Streck, E.L., Matte, C., Vieira, P., Rombaldi, F., Wannmacher, C.D., Wyse, A.T.S., 2002. Reduction of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to chemically induced hyperhomocysteinemia. *Neurochem. Res.* 27, 1593-1598.
- Streck, E.L., Matte, C., Vieira, P., Calcagnotto, T., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., Wyse, A.T.S., 2003 a. Impairment of energy metabolism in hippocampus of rats subjected to chemically-induced hyperhomocysteinemia. *Biochim. Biophys. Acta.* 1637, 187-192.
- Streck, E.L., Delwing, D., Tagliari, B., Matté, C., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., Wyse, A.T.S., 2003 b. Brain energy metabolism is compromised by the metabolites accumulating in homocystinuria. *Neurochem. Int.* 43, 597-602.
- Testa, I., Rabini, R.A., Corvetta, A., Danieli, G., 1987. Decreased Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in erythrocyte membrane from rheumatoid arthritis patients. *Scand. J. Rheumatol.* 16, 301-305.
- Ticku, M.K., Burch, T., 1980. Purine inhibition of [<sup>3</sup> H]- gamma -aminobutyric acid receptor binding to rat brain membranes. *Biochem. Pharmacol.* 29, 1217-1220.
- Tsakiris, S., Deliconstantinos, G., 1984. Influence of phosphatidylserine on (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-stimulated ATPase and acetylcholinesterase activities of dog brain synaptosomal plasma membranes. *Biochem. J.* 22, 301-307.

- Vasarhelyi, B., Sallay, P., Balog, E., Reusz, G., Tulassay, T., 1996. Altered Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> ATPase activity in uraemic adolescents. *Acta. Pediatr.* 85, 912-922.
- Veldhuis, W.B., Van der Stel, M., Delmas, F., Gillet, B., Veldnik, G.A., Vliegenthart, J.F., Nicolay, K., Bar, P.R., 2003. In vivo excitotoxicity induced by ouabain, a Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibitor. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 23, 62-74.
- Visser, J.E., Bar, P.R., Jinnah, H.A., 2000. Lesch-Nyhan disease and the basal ganglia. *Brain Res. Bull.* 32, 449-475.
- Van Der Hijden, H.T., De Pont, J.J., 1989. Cation sidedness in the phosphorylation step of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* 983, 142-152.
- Wang, X.Q., Xiao, A.Y., Sheline, C., Hyrc, K., Yang, A., Goldberg, M.P., Choi, D.W., Ping, Y.S., 2003. Apoptotic insults impair Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity as a mechanism of neuronal death mediated by concurrent ATP deficiency and oxidant stress. *J. Cell. Sci.* 116, 2099-2110.
- Weir, C.J., Muir, S.C., Walters, M.R., Lees, K.R., 2003. Serum Urate as an independent predictor of poor outcome and future vascular events after acute stroke. *Stroke.* 34, 1951-1957.
- Wu, X., Wakamiya, S., Vaishnav, R., Geske, C., Montgomery Jr., P., Jones, A., Bradley, C.T. 1994. Hyperuricemia and urate nephropathy in urate oxidase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:742-746.
- 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<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of rats. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 227S.

- Wyse, A.T.S., Wajner, M., Wannmacher, C.M.D., 1998. Kinetics of alanine reversal on the inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity by phenylalanine and phenyllactate in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats. *Med. Sci. Res.* 26, 141-143.
- Wyse, A.T.S., Streck, E.L., Barros, S.V., Brusque, A.M., Zugno, A.I., Wajner, M., 2000. Methylmalonate administration decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in cerebral cortex of rats. *Neuroreport.* 11, 2331-2334.
- Wyse, A.T.S., Streck, E.L., Worm, P., Wajner, M., Ritter, F., Netto, C.A., 2000. Preconditioning prevents the inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem. Res.* 25, 969-973.
- Wyse, A.T.S., Bavaresco, C.S., Bandinelli, C., Streck, E.L., Franzon, R., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., 2001. Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME prevents the decreases of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in midbrain of rats subjected to arginine administration. *Neurochem. Res.* 26, 515-520.
- Xiao, A.Y., Wei, L., Xia, S., Rothman, S., Yu, S.P., 2002. Ionic mechanism of ouabain-induced concurrent apoptosis and necrosis in individual cultured cortical neurons. *J. Neurosci.* 22, 1350-1362.
- Yu, Z.F., Buce-Keller, A.J., Goodman, Y., Mattson, M.P., 1998. Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture and against focal ischemic brain injury in vivo. *J. Neurosci. Res.* 53, 613-625.
- Zugno, A.I., Stefanello, F.M., Streck, E.L., Calcagnotto, T., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., Wyse, A.T.S., 2003. Inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat striatum by guanidinoacetate. *Int. J. Devl. Neurosci.* 21, 183-189.

Figure 1. Metabolic blockage of purine metabolism in Lesch-Nyhan disease. Abbreviations used are: HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; ADP, adenosine diphosphate; AMP, adenosine monophosphate; ATP, adenosine triphosphate; GDP, guanine diphosphate; GMP, guanosine monophosphate; GTP, guanosine triphosphate; IMP, inosine monophosphate; PPRP, phosphoribosylpyrophosphate; XO, xanthine oxidase

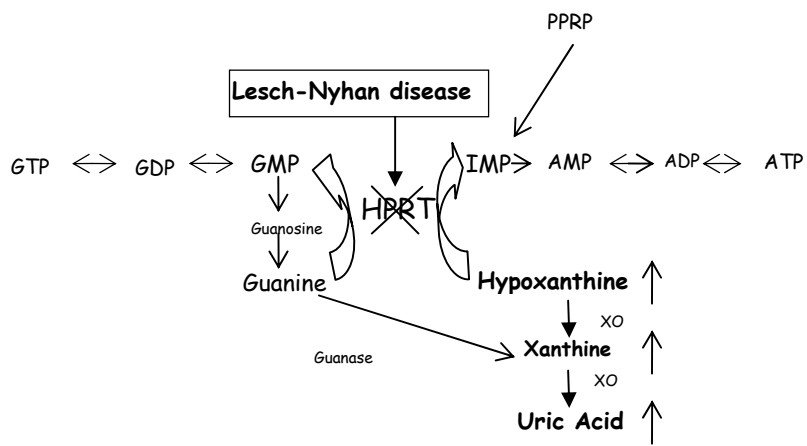
Figure 2. *In vitro* effect of hypoxanthine (hpx) on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity in synaptic plasma membranes from rat striatum. Results are expressed as mean ± S.D for four independent experiments performed in duplicate; \*p<0.05; \*\* p<0.001 compared to control (Duncan's multiple range test).

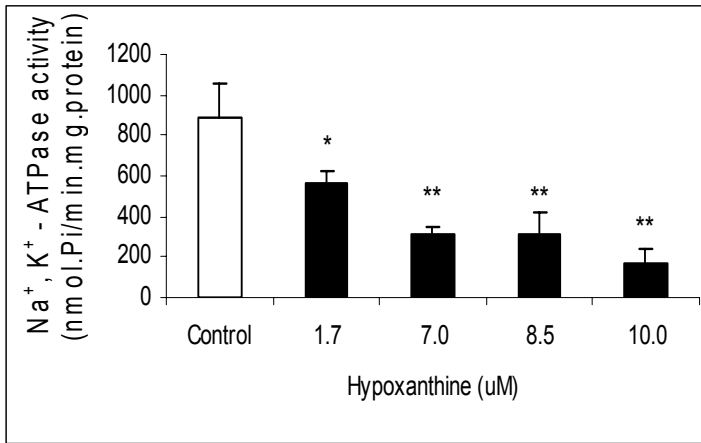
Figure 3. *In vitro* effect of xanthine(xan) on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity in synaptic plasma membranes from rat striatum. Results are expressed as mean ± S.D for four independent experiments performed in duplicate; \*p<0.05; \*\* p<0.001 compared to control (Duncan's multiple range test).

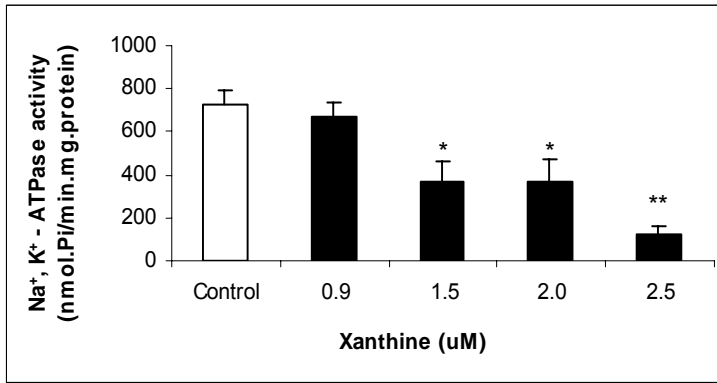
Figure 4. *In vitro* effect of uric acid on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity in synaptic plasma membranes from rat striatum. Results are expressed as mean ± S.D for four independent experiments performed in duplicate; \*p<0.05; \*\* p<0.001 compared to control (Duncan's multiple range test).

Figure 5. Kinetics of interaction between hypoxanthine (hpx), xanthine (xan) and uric acid on the inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity, plotted according to Chevillard et al. (1983). Data are a representative plot of three independent experiments performed in duplicate. Control Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity: 773 ± 95 nmol Pi released per min per mg protein. hpx: hypoxanthine; xan: xanthine

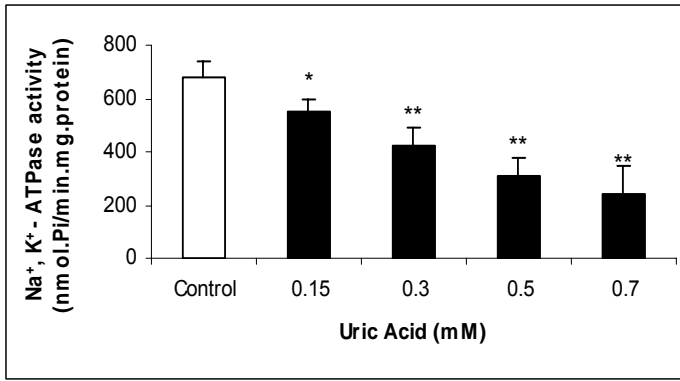
Figure 6. Kinetic analysis of the inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity caused by hypoxanthine in synaptic plasma membranes from rat striatum. The graph shows double-reciprocal plot of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity for ATP concentrations (0.05 – 0.4 mM) in the absence (♦) and in the presence of 7.0 μM (■) and 10 μM (▲) hypoxanthine. All the experiments were conducted at least four times and similar results were obtained; data presented were from individual experiments.

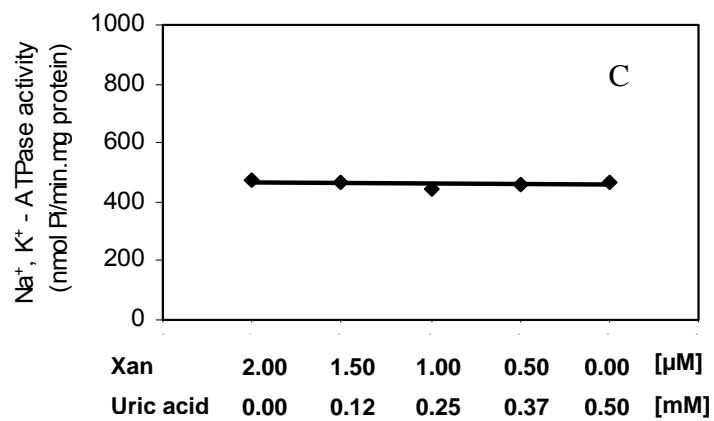
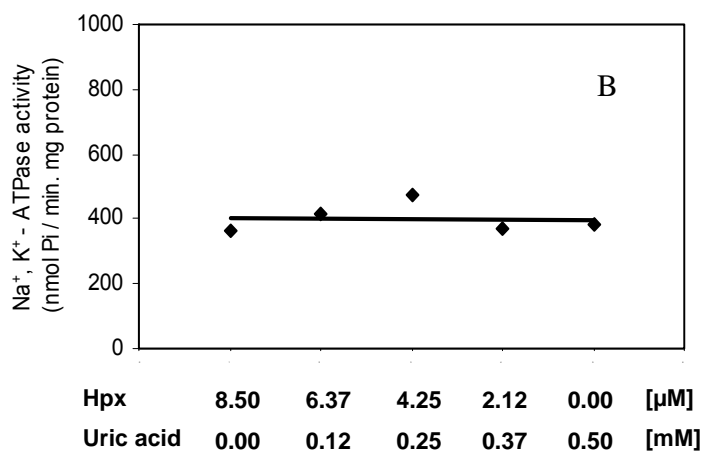
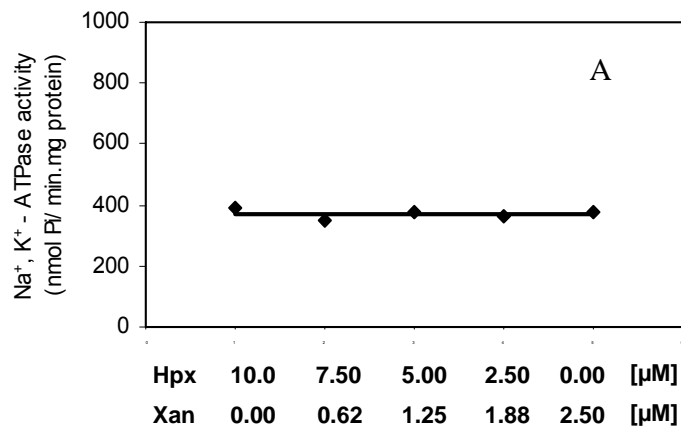


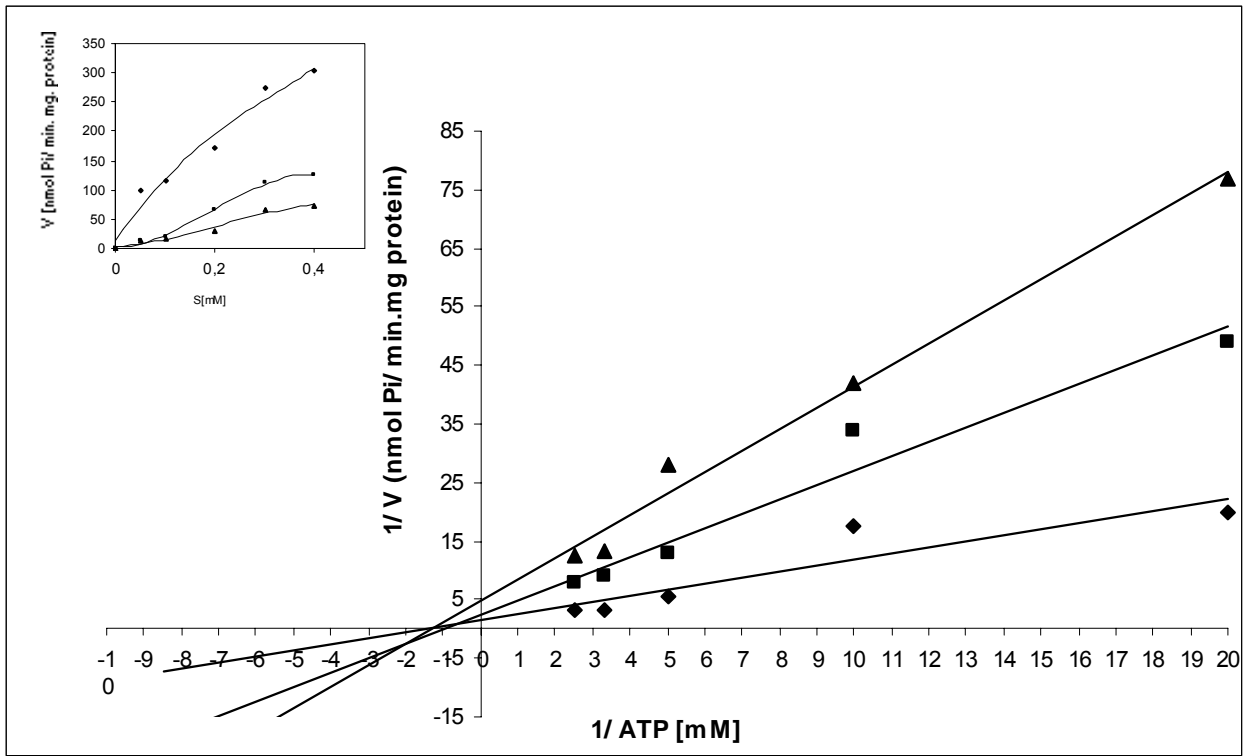












*Artigo 2*

**Inhibition of striatal Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity caused by hypoxanthine is probably mediated by oxidative stress**

Caren S. Bavaresco, Renata Franzon, Cristiane Matté, Clóvis M.D. Wannmacher, Moacir Wajner and Angela T.S. Wyse

Submetido para publicação na revista Neuroscience Research

**Inhibition of striatal Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity caused by hypoxanthine is probably mediated by oxidative stress**

Caren S. Bavaresco, Renata Franzon, Cristiane Matté, Clóvis M.D. Wannmacher,  
Moacir Wajner and Angela T.S. Wyse

Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
Porto Alegre, RS, Brazil

Reprint request to: Angela T.S. Wyse

Departamento de Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo

CEP 90035 – 003 Porto Alegre RS Brazil

Phone 55 51 3316 5573 Fax 55 51 3316 5535

E-mail: [wyse@ufrgs.br](mailto:wyse@ufrgs.br)

## **Abstract**

The main objective of this study was to investigate the effects of preincubation of rat striatum homogenate in the presence of hypoxanthine, an metabolite accumulated in Lesch Nyhan disease, on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in rat striatum. We also evaluated the effect of glutathione (GSH) and trolox, alone or combined with hypoxanthine, on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity. In addition, we also studied the effect of hypoxanthine on some parameters of oxidative stress namely total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) and thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) in the same rat cerebral structure. Results showed that hypoxanthine significantly inhibited  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity. GSH and Trolox did not alter  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity, but only GSH prevented the inhibitory effect of hypoxanthine on enzyme activity. Hypoxanthine significantly increased TBA-RS and reduced TRAP in rat striatum. These results suggest that the inhibition caused by hypoxanthine on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity could be mediated by oxidative stress and/or oxidation of thiol groups on the enzyme and might be involved in the neuronal dysfunction in patients affected by Lesch-Nyhan disease.

**Key Words:**  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase; Lesch-Nyhan; metabolic disease; hypoxanthine; glutathione, oxidative stress.

## 1. Introduction

Lesch Nyhan disease is an X-linked hereditary disorder caused by deficiency of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase activity (19,21,31,36) (Figure 1). Affected patients present hyperuricemia, spasticity, dystonia, mental retardation and self-mutilation behavior, which is characterized by biting of the lips, tongue and fingers with apparent tissue loss (21,22). In addition, patients also present dysfunction of the dopamine transmitter system of the basal ganglia (21). A common factor in Lesch Nyhan is that patients exhibit a characteristically raised level of hypoxanthine in urine (17), plasma and cerebrospinal fluid (17,34,37).

Although the underlying mechanisms of brain dysfunction in Lesch-Nyhan disease are poorly understood, the accumulation of oxypurines such as hypoxanthine has been proposed to contribute to the neurological dysfunction present in this disease (8,24,27,42) and other neurological diseases including hydrocephalus (39) and cerebral ischemia (15). In this context, reports from literature show that hypoxanthine accumulation provokes dopamine depletion in neuronal culture of cells (32) and that xanthine oxidase system significantly inhibited dopamine uptake in rat striatal synaptosomes (38). Furthermore, Chan and colleagues (5) demonstrated that a mixture of xanthine and xanthine oxidase could cause brain edema, probably mediated by oxidative stress. In addition, some evidences support the hypothesis that xanthines derivatives, such as methylxanthines, induce seizures and have convulsant action in rat brain (7,28). Besides this, high hypoxanthine levels could be found in other neurological disorders including hydrocephalus (39) and cerebral ischemia (15). It has been shown that the formation of free radicals by hypoxanthine/xanthine

oxidase could contribute to the destruction of blood-brain barrier observed in ischemic brain tissue (2).

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase (EC 3.6.1.37) is an enzyme embedded in the cell membrane, responsible for the generation of the membrane potential through the active transport of sodium and potassium ions in the central nervous system necessary to maintain neuronal excitability. It is present at high concentrations in brain, consuming 40 – 50% of the ATP generated in this tissue (9). It has been demonstrated that  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase is decreased in epilepsy (14), experimental model of cerebral ischemia (45), and in many neurodegenerative disorders, including Alzheimer's disease (18,25). Additionally, evidence shows that this enzyme is inhibited by free radical (20,25). In this context, we recently showed that antioxidants such as glutathione (GSH) prevent the inhibitory effect of homocysteine (40) and proline (12) on cerebral  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase activity in rats.

In the present study, we investigate the effect of preincubation of striatum homogenate in the presence of hypoxanthine on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in synaptic plasma membrane of rats. We also investigated the role of the antioxidants GSH and trolox (soluble vitamin E) on the effects elicited by hypoxanthine on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in synaptic plasma membranes of same cerebral structure. In addition, we investigated some parameters of oxidative stress namely total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) and thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) in rat striatum. Striatum was used because patients with this syndrome present characteristic alterations in the basal ganglia (21).

## **2. Experimental Procedure**



## *2.1. Animals and reagents*

Six-day-old-age rats were obtained from the Central Animal House of the Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. Animals were maintained on 12h /12h light/dark cycle (lights on from 7 a.m. to 7 p.m.) in air-conditioned constant temperature (22° C) colony room, and had free access to a 20% (w/w) protein commercial chow and water. Animal care followed the official governmental guidelines in compliance with the Federation of Brazilian Society for Experimental Biology and was approved by ethics committee of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

## *2.2. Tissue and homogenate preparation*

Animals were killed by decapitation without anesthesia, the brain was removed and the rat striatum was dissected. For Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase determination, striatum was homogenized in 10 volumes 0.32 mM sucrose solution containing 5.0 mM HEPES (pH 7.45) and 1.0 mM EDTA, pH 7.4. The homogenate was separately preincubated at 37° C for 1h with 10.0 μM hypoxanthine, 1.0 mM GSH, 1.0 mM trolox, or with 10.0 μM hypoxanthine plus 1.0 mM GSH, 10.0 μM hypoxanthine plus 1.0 mM trolox. Hypoxanthine and antioxidants were dissolved in 5.0 mM HEPES buffer, pH 7.45. Hypoxanthine concentration was chosen according to Puig and colleagues (33) and

GSH and trolox were chosen according to Avrova et al. (1). After preincubation, synaptic plasma membranes were prepared.

For total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) determinations, striatum was homogenized in 10 volumes (1:10, w/v) of 20.0 mM phosphate buffer containing 140.0 mM KCl, pH 7.4 (26). For thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), striatum was homogenized in 10 volumes (1:10) of 0.1 M glycine buffer, pH 8.6. Striatum homogenate was incubated at 37° C for 1 h in the absence (control group) or in the presence of 10.0 µM hypoxanthine (10). After incubation, oxidative stress parameters were measured.

### *2.3. Preparation of synaptic plasma membrane of striatum:*

Synaptic plasma membranes were prepared according to the method of Jones and Matus (23), with modifications (44). Striatal homogenate was centrifuged at 1,000 g for 20 min and the supernatant removed and centrifuged at 12000 x g for a further 20 min. The pellet was then resuspended in hypotonic buffer (5.0 mM Tris-HCl buffer, pH 8.1), incubated at 0°C for 30 min, and applied on a discontinuous sucrose density gradient consisting of successive layers of 0.3, 0.8 and 1.0 M. After centrifugation at 69,000 x g for 2 h, the fraction at the 0.8–1.0 M sucrose interface was taken as the membrane enzyme preparation.

### *2.4. Determination of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity*

The reaction mixture for the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase assay contained 5.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 80.0 mM NaCl, 20.0 mM KCl, and 40.0 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, in a final volume of 200 μL. The reaction was started by the addition of ATP (disodium salt, vanadium free) to a final concentration of 3.0 mM. Controls were assayed under the same conditions with the addition of 1.0 mM ouabain. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity was calculated by the difference between the two assays (41). Released inorganic phosphate (Pi) was measured by the method of Chan and colleagues (6). Enzyme specific activity was expressed as nmol Pi released per min per mg of protein.

### 2.5. TRAP assay

TRAP represents the total antioxidant capacity of the tissue and was determined by measuring the luminol chemiluminescence intensity induced by 2,2'-Azo-bis (2-amidinopropane) (ABAP) by the method of Lissi and colleagues (26). Striatum homogenate was incubated at 37° C for 1 h in the absence (control group) or in the presence of 10.0 μM hypoxanthine. Briefly, 4.0 ml of 10.0 mM ABAP were added to the vial and background chemiluminescence was measured. Ten μl of 0.2 μM Trolox or homogenates (1:10 in 0.1 M glycine buffer, pH 8.6) were added and chemiluminescence was measured until it reached the initial levels. The addition of Trolox or tissue homogenate to the incubation medium reduces the chemiluminescence. The time necessary to return to the levels present before the addition was considered to be the induction time (IT). IT is directly proportional to the

antioxidant capacity of the tissue and was compared to the IT of Trolox. The results were represented as nM Trolox / mg protein.

#### 2.6. *TBA – RS assay*

TBA–RS was determined according to the method described by Esterbauer and Chessman (10). Striatum homogenate was incubated at 37° C for 1 h in the absence (control group) and in presence of 10.0 µM hypoxanthine. Briefly, 300 µl of cold 10% (w/v) trichloroacetic acid were added to 150 µl of homogenate and centrifuged at 3,000 g for 10 min. Three hundred µl of the supernatant were transferred to a pyrex tube and incubated with 300 µl of 0.67% (w / v) thiobarbituric acid in 7.1% (w / v) sodium sulfate in a boiling water bath for 25 min. The mixture was allowed to cool on water for 5 min. The resulting pink stained TBA–RS was determined in a spectrophotometer at 535 nm. Calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane and each curve point was subjected to the same treatment as the homogenate. TBA–RS was calculated as nmol TBA-RS/ mg protein

#### 2.5. *Protein determination*

Protein was measured by the method of Bradford (3) using bovine serum albumin as standard.

#### 2.6. *Statistical analysis*

Data were analyzed by the Student t test or by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Duncan's multiple range test when the F-test was significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Science (SPSS) software in a PC- compatible computer.

### 3. Results

Figure 2 shows the effect of 10  $\mu$ M hypoxanthine on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase activity in synaptic plasma membrane from homogenate of rat striatum. Hypoxanthine significantly inhibited (45%)  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase activity [ $t(8) = 5.197$ ;  $p < 0.01$ ].

To test whether the hypoxanthine inhibitory activity was mediated by free radicals formation, we evaluated the effect of antioxidants agents GSH, trolox, at 1.0 mM concentration, alone or combined with 10  $\mu$ M hypoxanthine on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase activity (Figure 3). *Post hoc* analyses showed that GSH and trolox *per se* did not alter  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity. However, when GSH was incubated in the presence of hypoxanthine, no effect on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity was detected, in contrast to trolox, which did not prevent the inhibition of the enzyme activity elicited by hypoxanthine [ $F(5,22)=13.83$ ;  $p < 0.01$ ]. These results suggest that hypoxanthine inhibits  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity by oxidation of sulfhydryl groups of the enzyme.

We also tested the *in vitro* effect of hypoxanthine, at same concentration, on TBA-RS (an index of lipid peroxidation) and TRAP (an index of antioxidant defenses) in rat striatum in order to confirm whether the inhibitory effect of hypoxanthine on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity could be attributed to decreased antioxidant defenses,

peroxidation of lipid membrane and/or oxidative stress. Figure 4 and 5 show that hypoxanthine significantly increased (40%) TBA-RS [t(6)=3.69; p<0.05] and decreased (22%) TRAP [t(6)=3.10; p<0.05 ].

#### 4. Discussion

In the present study, we demonstrated that addition of hypoxanthine to the incubation medium, at the concentration found in Lesch-Nyhan patients, significantly inhibited (45%) Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in synaptic plasma membrane from homogenate of rat striatum. Since studies have been shown that inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity can be prevented by antioxidants *in vitro* (1,12,40), we investigated the effects of various antioxidants on the inhibitory activity of hypoxanthine on this enzyme activity. Trolox (peroxyl radical trapping agent) and GSH (SH-group protecting agents) *per se* did not alter Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity. However, GSH, that acts directly as a thiol-reducing agent (30), was able to prevent the inhibitory effect of hypoxanthine on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity, suggesting that this inhibition may be mediated by oxidation of thiol groups on the enzyme. We also observed that trolox had no effect on the inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity provoked by hypoxanthine, indicating that significant peroxidation of membrane lipids is unlikely. On the other hand, based on our results showing that hypoxanthine provokes increased TBA-RS, an index of lipid peroxidation, we consider that the lack of effect of trolox, a known peroxyl radical trapping agent on the inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity caused by hypoxanthine could be attributed to an insufficient concentration of trolox used in this

study to prevent the lipid peroxidation or the active reduced vitamin would be rapidly consumed. We are presently undertaking experiments to address this question.

We also observed in the present study that hypoxanthine increased TBA-RS and decreased TRAP in striatum of 6-day-old rats, indicating that hypoxanthine induces free radical production and reduces the cellular antioxidant defenses *in vitro*. These results are in agreement with other studies showing that hypoxanthine leads to free radical production (2,5).

Although the exact mechanism through which hypoxanthine inhibits  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity is yet unknown, the present *in vitro* findings showing that GSH (thiol reducing agent) prevented the inhibitory action of hypoxanthine on this enzyme suggest the involvement of reactive oxygen species and SH group modifications in this effect. This reinforces the results obtained here and in other studies showing that hypoxanthine leads to free radical production (2,5), which are probably responsible for the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity inhibition induced by the purine. These results are in agreement with previous works that show that GSH prevents the inhibitory effect of homocysteine (40) and proline (12) on cerebral  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  - ATPase activity in rats, indicating that sulfhydryl groups are critical for the function of this enzyme.

Since oxidative stress is defined as the imbalance between free radical production and antioxidant defenses, our results indicating that hypoxanthine induces free radical generation (enhanced TBA-RS) and reduces the antioxidant defenses (decreased TRAP) strongly suggest that hypoxanthine elicits oxidative stress in the brain. At this point it should be reminded that the brain is highly susceptible to oxidative stress, because the brain has low cerebral antioxidant defenses compared

to other tissues (11,16,35) a fact that makes this tissue more vulnerable to increases in reactive oxygen species. In fact, an increasing number of pathological situations involving the CNS, such as neurodegenerative disorders, seizures, ischemia/reperfusion, and dementia, have been associated with oxidative stress (16).

Inhibition of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase activity has been associated with excitotoxicity (13,25). In this respect, it has been demonstrated that the impairment of the enzyme activity may lead striatal neurons more sensitive to the neurotoxicity of glutamate (4). Additionally, studies demonstrated that neuronal death associated with a decrease in  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase activity is mediated by intracellular depletion of  $\text{K}^+$  and accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  (46). In agreement with these findings, other studies indicated that  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase inhibition, in presence of a non-lethal insult, activates the apoptotic cascade and neuronal injury probably by amplifying the disruption on  $\text{K}^+$  homeostasis (43).

In conclusion, we showed here that hypoxanthine increases oxidative stress and inhibits  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in rat striatum. It is proposed that the inhibition of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase caused by hypoxanthine is possibly mediated by oxidations of essential thiol groups of the enzyme, since GSH prevented this inhibition. However, if the stimulation of oxidative stress and the inhibition of this important enzyme caused by hypoxanthine as demonstrated in the present study also occur in humans, it may be presumed that these biochemical parameters might be associated with the neurological symptoms present in Lesch-Nyhan patients.

## **Acknowledgements**

This work was supported in part by grants from CNPq – Brazil, FAPERGS, RS-Brazil, and Programa de Núcleos de Excelência-Financiadora de Estudos e Projetos (PRONEX II - FINEP-Brazil).

## **References**



- 1) Avrova, N.F., Victorov, I.V., Tyurin, V.A., Zakharova, I.O., Sokolova, T.V., Andreeva, N.A., Stelmaschuck, E.V., Tyurina, Y.Y., Gonchar, V.S. 1998. Inhibition of glutamate-induced intensification of free radical reactions by gangliosides: possible role in their protective effect in rat cerebellar granule cells and brain synaptosomes. *Neurochem. Res.* 23:945-952.
- 2) Beckman, J.S., Liu, T.H., Hogan, E.L., Freeman, B.A., Hsu, C.Y. 1987. Oxygen free radicals and xanthine oxidase in cerebral ischemic injury in the rat. *Soc. Neurosci. Abstr.* 13:1498.
- 3) Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein –die binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- 4) Calabresi, P., De Murtas, M., Pisani, A., Stefani, A., Sancassario, G., Mercuri, N.B., Bernardi, G. 1995. Vulnerability of medium spiny striatal neurons to glutamate: role of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. *Eur. J. Neurosci.* 7:1674-1683.
- 5) Chan, P.H., Schmidley, J.W., Fishman, R.A., Longar, S.M. 1984. Brain injury, edema and vascular permeability changes induced by oxygen derived free radicals. *Neurology.* 34:315-320.
- 6) Chan, K.M., Delfert, D., Junger, K.D. 1986. A direct colorimetric assay for Ca<sup>+</sup> -stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157:375-380.
- 7) Cutrufo, C., Bortot, L., Gianchetti, A., Manzini, S. 1992. Differential effects of various xanthines on pentyletetrazole-induced seizures in rats: an EEG and behavioral study. *Eur. J. Pharmacol.* 3:1-6.

- 8) Dasheiff, R.M. 1980. Benzodiazepinic treatment for Lesch-Nyhan syndrome? *Dev. Med. Child. Neurol.* 22:101-102.
- 9) Erecinska, M., Silver, I.A. 1994. Ions and energy in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 7:21-29.
- 10) Esterbauer, H., Chessman, K.H. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods. Enzymol.* 186:407-421.
- 11) Floyd, R.A. 1999. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222:236-245.
- 12) Franzon, R., Lamers, M.L., Stefanello, F.M., Wannmacher, C.D., Wajner, M., Wyse, A.T.S. 2003. Evidence that oxidative stress is involved in the inhibitory effect of proline on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity in synaptic plasma membrane of rat hippocampus. *Int. J. Devl. Neurosci.* 21:303-307.
- 13) Golden, W.C., Brambrink, A.M., Traystman, R.J., Martin, L.J. 2001. Failure to sustain recovery of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase function is a possible mechanism for striatal neurodegeneration in hypoxic-ischemic newborn piglets. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 81:94-102.
- 14) Grisar, T. 1984. Glial and neuronal Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-pump in epilepsy. *Ann. Neurol.* 16 (Suppl.):128-134.
- 15) Hagberg, H., Andersson, P., Lacarewicz, J., Jacobson I., Butcher, S., Sandberg, M. 1987. Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine and xanthine to tissue nucleotides and purines in rat striatum during transient ischemia. *J. Neurochem.* 49:227-231.

- 16) Halliwell, B. 1996. Free radicals, protein and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 24:1023-1027.
- 17) Harkness, R.A., McCreanor, G.M., Watts, R.W. 1988. Lesch-Nyhan syndrome and its pathogenesis: purine concentrations in plasma and in urine with metabolite profiles in CSF. *J. Inher. Metab. Dis.* 11:239-252.
- 18) Hattori, N., Kitagawa, K., Higashida, T., Yagyu, K., Shimohama, S., Wataya, T., Perry, G., Smith, M.A., Inagaki, C. 1998.  $\text{Cl}^-$  - ATPase and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase activities in Alzheimer's disease brains. *Neurosci. Lett.* 254:141-144.
- 19) Herderson, J.F. 1968. Possible functions of hypoxanthine – guanine phosphoribosyltransferase and their relation to the biochemical pathology of the Lesch-Nyhan syndrome. *Fed. Proc.* 2:302-304.
- 20) Jamme, I., Petit, E., Divoux, D., Gerbi, A., Maixent, J.M., Nouvelot, A. 1995. Modulation of mouse cerebral  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport.* 7:333-337.
- 21) Jinnah, H.A. & Friedmann, T. 2001. Lesch Nyhan disease and its variants. Pages: 2537-2569, In Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (eds), *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, McGraw-Hill, Inc., 8<sup>th</sup> Ed, New York.
- 22) Jinnah, H.A., Gage, F.H., Friedmann, T. 1990. Animal models of Lesch-Nyhan syndrome. *Brain. Res. Bull.* 25:467-475.
- 23) Jones, D.H., Matus, A.I. 1974. Isolation of synaptic plasma membrane from brain by combined flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim. Biophys. Acta.* 356:276-287.

- 24) Kisch, S.J., Fox, I.H., Kapur, B.M., Lloyd, K.G., Hornykiewicz, O. 1985. Brain benzodiazepine receptor binding and purine concentration in Lesch-Nyhan syndrome. *Brain. Res.* 336:117-123.
- 25) Lees, G.J. 1993. Contributory mechanism in the causation of neurodegenerative disorders. *Neurosci.* 54:287-322.
- 26) Lissi, E., Pascual, C., and Del Castillo, M.D. 1992. Luminol luminescence induced by 2,2' -azo-bis (2-amidinopropane) thermolysis. *Free Rad. Res. Comm.* 17:299-311.
- 27) Ma, M.H.Y., Stacey, N.C., Connolly, G.P. 2001. Hypoxanthine impairs morphogenesis and enhances proliferation of a neuroblastoma model of Lesch Nyhan syndrome. *J. Neurosci. Res.* 63:500-508.
- 28) Mares, P., Kubova, H., Czuczwar, S.J. 1994. Aminophylline exhibits convulsant action in rats during ontogenesis. *Brain. Dev.* 16:296-300.
- 29) Marks, J.F., Baum, J., Keele, D.K., Kay, J.L., MacFarlen, A. 1968. Lesch-Nyhan syndrome treated from the early neonatal period. *Pediatrics* 42:357-359.
- 30) Meister, A., and Anderson, M.E. 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52:711-760.
- 31) Nyhan, W.L., Oliver, W.J., Lesch, M. 1965. A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function II. *J. Pediatr.* 67:439-444.
- 32) Palmour, R.M., Heshka, T.W., Ervin, F.R., 1989. Hypoxanthine accumulation and dopamine depletion in Lesch-Nyhan disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 253:165-172.

- 33) Puig, J.G., Jimenez, M.L., Mateos, F.A., Fox, I.H. 1989. Adenine nucleotide turnover in hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase: evidence for an increased contribution of purine biosyntheses de novo. *Metabolism*. 38:410-418.
- 34) Puig, J.G., and Mateos, F.A. 1993. The biochemical basis of HGPRT deficiency. Pages 12-26, In: Gresser, U. (ed), *Molecular genetics, biochemistry and clinical aspects of inherited disorders of purine and pyrimidine metabolism*, Springer-Verlag, New York.
- 35) Reznick, A.Z., and Packer, L. 1993. Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. Pages 425-437, In: Poli, G., Albano, E., and Dianzani, M.U. (eds), *Free Radicals: from Basic Science to Medicine*, Birkhäuser Verlag, Basel.
- 36) Rijksen, G., Staal, G.E.J., Van der Vlist, M.J.M., Beerner, F.A., Troost, J., Gutensohn, W., Van Laarhoven, J.P.R.M., De Bruyn, C.H.M.M. 1981. Partial hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase deficiency with full expression of the Lesch – Nyhan syndrome. *Hum. Gen.* 57:39-47.
- 37) Rosenbloom, R.M., Henderson, J.F., Caldwell, I.C., Kelley, W.N., Seegmiller, J.E. 1967. Inherited disorder of purine metabolism. *JAMA*. 202:175-177.
- 38) Scheuch, C.H., Berndt, C.H., Gross, J., Poulsen, J.P., Saugstad, D.O., Haberland, A. 1989. Influence of the hypoxanthine / xanthine oxidase system on striatal (3H) dopamine uptake. *Biomed. Biochim. Acta*. 48:S212 -216.
- 39) Schmidt, H., Siems, W.G., Grune, T., Grauel, E.L. 1995. Concentration of purine compounds in the cerebrospinal fluid of infants suffering from sepsis, convulsions and hydrocephalus. *J. Perinat. Med.* 23:167-174.

- 40) Streck, E.L., Zugno, A.I., Tagliari, B., Franzon, R., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., Wyse, A.T.S. 2001. Inhibition of rat brain  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity induced by homocysteine is probably mediated by oxidative stress. *Neurochem. Res.* 26:1195-1200.
- 41) Tsakiris, S., Deliconstantinos, G. 1984. Influence of phosphatidylserine on  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -stimulated ATPase and acetylcholinesterase activities of dog brain synaptosomal plasma membranes. *Biochem. J.* 22:301-307.
- 42) Visser, J.E., Bär, P.R., Jinnah, H.A. 2000. Lesch-Nyhan disease and the basal ganglia. *Brain Res. Bull.* 32:449-475.
- 43) Wang, X.Q., Xiao, A.Y., Sheline, C., Hyrc, K., Yang, A., Goldberg, M.P., Choi, D.W., Ping, Y.S. 2003. Apoptotic insults impair  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity as a mechanism of neuronal death mediated by concurrent ATP deficiency and oxidant stress. *J. Cell. Sci.* 116:2099-2110.
- 44) 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  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of rats. *Biochem. Soc. Trans.* 23:227S.
- 45) Wyse, A.T.S., Streck, E.L., Worm, P., Wajner, M., Ritter, F., Netto, C.A. 2000. Preconditioning prevents the inhibition of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem. Res.* 25:969-973.
- 46) Xiao, A.Y., Wei, L., Xia, S., Rothman, S., Yu, S.P. 2002. Ionic mechanism of ouabain-induced concurrent apoptosis and necrosis in individual cultured cortical neurons. *J. Neurosci.* 22:1350-1362.



Figure 1: Purine metabolism. Abbreviations used are: HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; ADP, adenosine diphosphate; AMP, adenosine monophosphate; ATP, adenosine triphosphate; GDP, guanine diphosphate; GMP, guanosine monophosphate; GTP, guanosine triphosphate; IMP, inosine monophosphate; PPRP, phosphoribosylpyrophosphate; XO, xanthine oxidase.

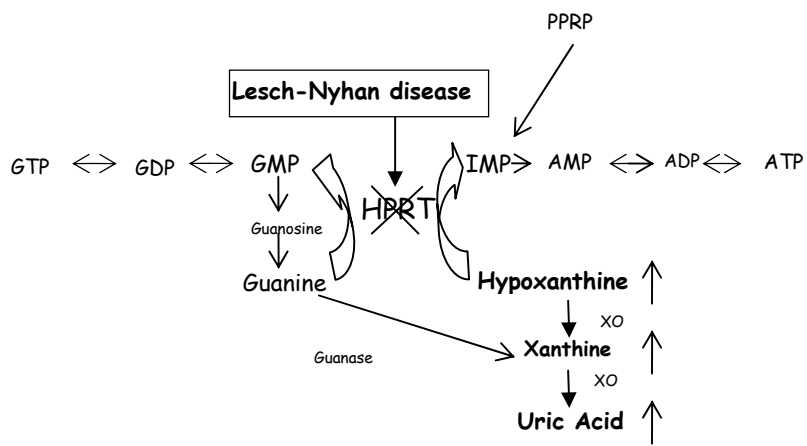
Figure 2. Effect of hypoxanthine on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase activity in the synaptic plasma membrane from striatum of rats. Striatum homogenates were incubated at 37° C for 1 h with hypoxanthine and the enzyme activity was determined after synaptic plasma membrane preparation. Data are means  $\pm$  SD for four independent experiments. \*  $p < 0.01$  compared to control (Duncan's multiple range test). Hpx - hypoxanthine

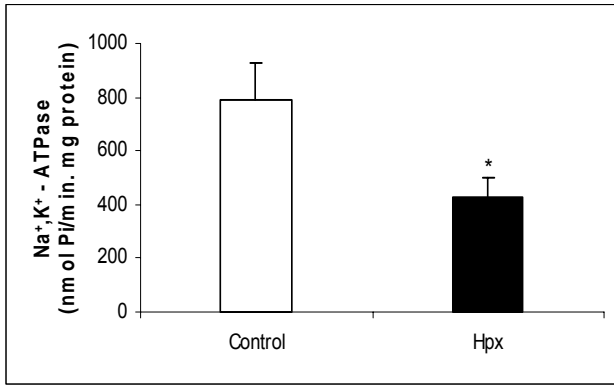
Figure 3. Effect of glutathione and trolox on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase activity in the synaptic plasma membrane from rat striatum in the presence or absence of hypoxanthine. Homogenates were incubated at 37° C for 1 h with 10  $\mu\text{M}$  hypoxanthine, 1.0 mM GSH and 1.0 mM trolox and the enzyme activity was determined after synaptic plasma membrane preparation. Data are means  $\pm$  SD for four independent experiments performed in duplicate. \*  $p < 0.01$  compared to control (Duncan's multiple range test). Hpx – hypoxanthine; GSH - glutathione

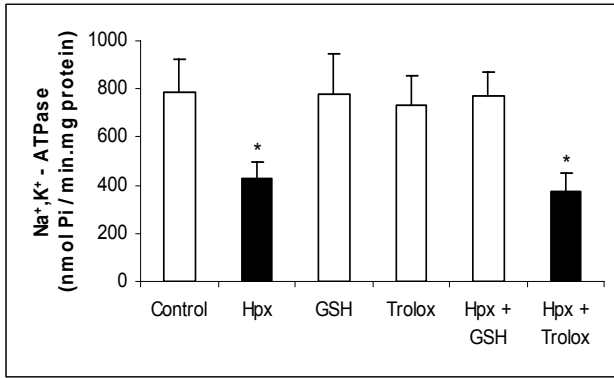
Figure 4. Effect of hypoxanthine on TBA-RS in rat striatum. Data are means  $\pm$  SD for four independent experiments performed in duplicate. \*  $p < 0.01$  compared to control (Duncan's multiple range test). Hpx – hypoxanthine.

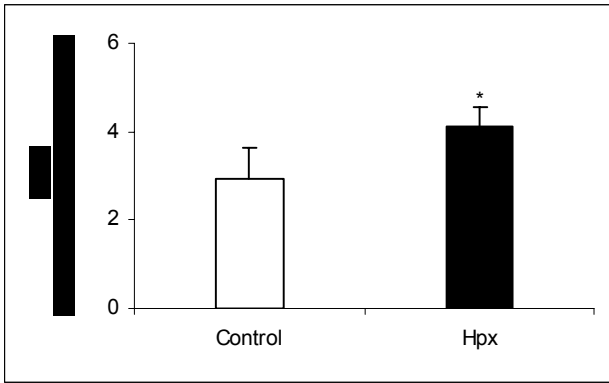


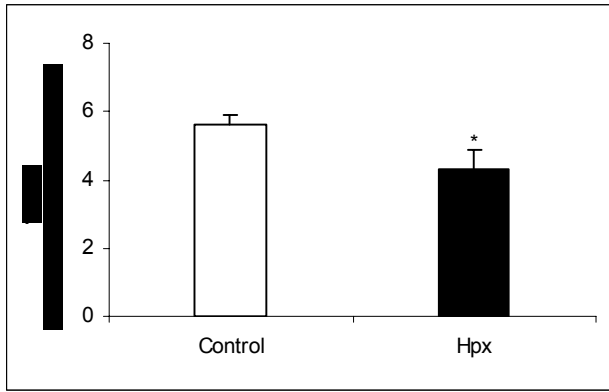
Figure 5. Effect of hypoxanthine on TRAP in rat striatum. Data are means  $\pm$  SD for four independent experiments performed in duplicate. \*  $p < 0.01$  compared to control (Duncan's multiple range test). Hpx – hypoxanthine.











### 3.0 DISCUSSÃO

A doença de Lesch-Nyhan é um erro inato do metabolismo das purinas, de característica recessiva ligado ao sexo. Caracteriza-se, bioquimicamente, pela deficiência na atividade da enzima HGPRT, resultando em acúmulo tecidual de hipoxantina, xantina e ácido úrico. Os pacientes portadores dessa desordem são assintomáticos ao nascimento, desenvolvendo as primeiras manifestações clínicas da doença entre 3 e 6 meses de vida. O quadro clínico manifestado é bastante característico e inclui hiperuricemia, gota, alterações motoras e cognitivas, retardo mental, espasticidade e automutilação (NYHAN, 1978, VISSER et al., 2000, JINNAH & FRIEDMANN, 2001). Dados na literatura demonstraram uma redução seletiva do conteúdo dopaminérgico dos neurônios localizados no estriado, similares àqueles encontrados em pacientes portadores da doença de Parkinson (VISSER et al., 2002).

As terapias propostas para a síndrome de Lesch-Nyhan apresentam um enfoque estritamente sintomático. As utilizações de fármacos a fim de prevenir as alterações renais e cerebrais têm sido descritas, todavia não apresentam eficácia absoluta (VISSER et al., 2000, DeANTONIO et al., 2002). As alterações relacionadas com o comportamento e, particularmente, as manifestações autodestrutivas são muito difíceis de serem tratadas. As alternativas terapêuticas consistem de terapia seguida de exercícios de relaxamento, autocontrole frente às situações estressantes e eletrochoque (OLSON & HOULIHAN, 2000).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar os mecanismos envolvidos no dano cerebral presente na síndrome de Lesch-Nyhan. Evidências na literatura sugerem que o acúmulo de oxipurinas poderia ser tóxico para o sistema nervoso central. Neste contexto, Ma e colaboradores (2001) demonstraram que altas concentrações de hipoxantina, similares às encontradas em pacientes portadores da doença, provocam alterações no desenvolvimento neuronal, sugerindo um possível efeito direto da hipoxantina na etiologia da doença. Neste contexto, estudos demonstraram que altas concentrações de hipoxantina e xantina podem ser metabolizadas pela enzima xantina oxidase, resultando na formação de radicais livres (PARKES & GRANGER, 1986).

Palmour e colaboradores (1989) demonstraram que o acúmulo de hipoxantina provoca depleção de dopamina em cultura de células neuronais. Além disso, evidências mostram que a hipoxantina e a xantina podem ligar-se a receptores benzodiazepínicos e interferir na função normal desses receptores (TICKU & BURCH, 1980).

Recentes trabalhos demonstram que pacientes com altos níveis séricos de ácido úrico apresentam uma maior chance de desenvolverem acidentes vasculares cerebrais e arteriosclerose (NIETO, et al., 2000, WEIR et al., 2003). Além disso, o aumento dos níveis de ácido úrico está associado ao aumento na produção de radicais livres, demonstrando um efeito pró-oxidante condicional (ABUJA, 1999, WEIR et al., 2003). No entanto, estudos mostram que essa substância não está



aumentada no cérebro e no liquor de pacientes com a doença de Lesch-Nyhan (ROSENBLOOM, et al., 1967, RIJKSEN et al., 1981).

A  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase, enzima integral de membrana, é responsável pela manutenção do equilíbrio entre os íons sódio e potássio intracelular, sendo que a redução na sua atividade está relacionada a significativos danos neuronais, possivelmente através de mecanismos tóxicos para as células (LEES, 1993, BEN ARI, 1985).

Neste trabalho, primeiramente, foram investigados os efeitos *in vitro* da hipoxantina, xantina e ácido úrico sobre a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase em estriado de ratos neonatos. Essa estrutura cerebral foi utilizada porque as lesões nos gânglios da base são evidentes nos pacientes portadores da doença de Lesch-Nyhan (VISSER et al., 2000, JINNAH & FRIEDMANN, 2001). Nossos resultados mostraram que a hipoxantina, xantina e ácido úrico inibem significativamente a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase de forma dose dependente. A inibição máxima foi obtida com 10  $\mu\text{M}$  de hipoxantina, 2.5  $\mu\text{M}$  de xantina e 0.7 mM de ácido úrico, resultando, respectivamente, em 80%, 82% e 64% de redução da atividade enzimática.

Estudos prévios realizados em nosso grupo demonstraram que alguns aminoácidos possuem um mesmo sítio de ligação na  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase. Neste contexto, dados mostraram que a fenilalanina e seus metabólitos inibem a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase e que esses compostos não apresentam efeito inibitório somatórios quando testados conjuntamente. Em adição, os estudos de interação

cinética entre fenilalanina e fenilactato mostraram que estes compostos competem por um mesmo sítio de ligação na enzima (WYSE et al., 1995). Baseados nesses estudos, e tendo em vista que as oxipurinas testadas apresentam estruturas químicas semelhantes e inibem a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase de uma forma similar, realizamos estudos cinéticos de interação entre hipoxantina, xantina e ácido úrico. Nossos resultados sugerem a existência de um mecanismo similar de inibição desses compostos entre si sobre a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase e que essas substâncias agem no mesmo sítio de ligação na enzima.

Adicionalmente, tendo em vista que os três compostos inibem a atividade enzimática através de um mecanismo similar e que a hipoxantina é o principal metabólito acumulado na doença de Lesch-Nyhan, realizaram-se estudos com o objetivo de verificar o mecanismo cinético de inibição da hipoxantina sobre a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase. Os nossos resultados mostraram que a hipoxantina reduz a atividade enzimática de forma não competitiva com o substrato ATP.

A neurotoxicidade provocada pela inibição da atividade  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase está associada a várias patologias neurológicas, tais como epilepsia, isquemia cerebral, esquizofrenia e doenças de Parkinson e de Alzheimer (KUMAR & KURUP, 2002, KURUP & KURUP, 2002). Redução na atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase em torno de 20% está associada ao desequilíbrio nas concentrações intra e extracelulares de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  cerebrais, favorecendo a morte neuronal (HENVER et al, 1992, XIAO et al., 2002). Adicionalmente, a inibição da atividade dessa enzima provoca um

aumento na sensibilidade dos neurônios estriatais aos efeitos neurotóxicos provocados pelo glutamato (CALABRESI et al., 1995).

Evidências demonstram que a inativação da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase em modelo animal de hipóxia / isquemia está envolvida na necrose em neurônios estriatais (GOLDEN et al., 2001). Além disso, a inibição dessa enzima está relacionada com o processo de calcificação nos gânglios da base, através do aumento nos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (KURUP & KURUP, 2002). Recentes trabalhos demonstram que a redução na atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase pela digoxina provoca a depleção intracelular de  $\text{Mg}^{2+}$  e o aumento dos níveis  $\text{Ca}^{2+}$  o que poderia contribuir para o aumento da peroxidação lipídica (RAVIKUMAR et al., 2000).

Dados na literatura demonstram que a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase é inibida por radicais livres (LEES, 1993). Malfatti e colaboradores (2003) demonstraram que a injeção intra-estriatal do ácido metilmalônico diminui a atividade da enzima e aumenta os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em estriado de ratos. Resultados de nosso laboratório mostraram que a inibição dessa enzima causada pela prolina (FRANZON et al., 2003), arginina (BAVARESCO et al., 2003) e homocisteína (STRECK et al., 2001) é mediada pelo estresse oxidativo. Além disso, alguns autores observaram que a inibição da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase pode ser prevenida por antioxidantes in vitro (AVROVA et al. 1998, STRECK et al., 2001, WYSE et al., 2002, FRANZON et al, 2003).

Os radicais livres são, por definição, moléculas ou fragmentos de moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL, 1996), os quais podem exercer seus efeitos nocivos através peroxidação de lipídios de membrana, inativação de enzimas através da oxidação dos grupamentos sulfidríla enzimáticos, despolimerização de polissacarídeos e ruptura de ácidos nucleicos. A interação entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes fazem parte do metabolismo celular fisiológico e alterações neste sistema redox apresentam um grande papel no desenvolvimento das disfunções do sistema nervoso central (CHOI, 1993).

Um mecanismo eficaz de proteção antioxidante consiste na transferência de elétrons aos compostos reativos para saturar suas afinidades eletrônicas. A fim de manter o equilíbrio redox celular, é necessária a presença de um meio intracelular capaz de prover equivalentes de redução (CRUZ et al., 2003). Entre as defesas antioxidantes mais importantes podemos ressaltar as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione redutase, além de moléculas de baixo peso molecular como glutathione reduzida (GSH), ácido ascórbico,  $\alpha$  – tocoferol,  $\beta$  – caroteno e quelantes de metais (CHOI, 1993).

Em um grande número de células, o GSH possui um papel importante na neutralização das espécies reativas de oxigênio. Apesar do GSH poder reagir espontaneamente com radicais livres, sua maior eficácia antioxidante está associada às enzimas glutathione peroxidase, glutathione redutase e glutathione transferase (CRUZ et al., 2003). Adicionalmente, dados na literatura demonstram que há um decréscimo de 30-40% na concentração de GSH, sem alteração dos níveis de

glutathiona oxidada (GSSG), na substância negra compacta de pacientes portadores do mal de Parkinson (SCHULZ et al., 2000).

Aliada a ação do GSH, o  $\alpha$  – tocoferol (vitamina E) atua bloqueando a propagação da cascata de peroxidação ao longo da membrana celular (CHOI, 1993). Alguns autores sugerem um papel preventivo e terapêutico do  $\alpha$  – tocoferol em desordens neurodegenerativas como nas doenças de Parkinson e de Alzheimer (CHOI, 1993, LOPEZ & BECKER, 2002, BEAL, 2002).

O cérebro é particularmente suscetível ao estresse oxidativo, uma vez que contém grandes quantidades de lipídios insaturados e apresenta um alto consumo de oxigênio proveniente de sua alta taxa metabólica (REZNICK & PACKER, 1993, CHOI, 1993, HALLIWELL, 1996; FLOYD, 1999). Particularmente, o estriado apresenta grandes quantidades de ferro e melanina, os quais podem catalisar a produção de radical hidroxila frente a processos oxidativos (VISSER et al., 2002). Além disso, o cérebro apresenta baixos níveis de defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas (REZNICK & PACKER, 1993, CHOI, 1993, HALLIWELL, 1996; FLOYD, 1999).

Várias hipóteses têm sido levantadas para elucidar os mecanismos pelos quais as oxipurinas podem exercer efeitos tóxicos sobre o sistema nervoso central. Através de uma série de reações contínuas, hipoxantina e xantina são convertidas a ácido úrico pela ação da xantina oxidase, com a produção de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido (HORTON, 2003). Chan e colaboradores (1984) demonstraram que

a mistura de hipoxantina e xantina oxidase pode causar edema cerebral, associada à destruição da barreira hematoencefálica em processos isquêmicos, através do aumento na formação de radicais livres (BECKMAN et al., 1987).

Baseado nos dados acima citados, nós decidimos também investigar o efeito da pré-incubação dos homogeneizados de estriado de ratos com hipoxantina, sobre a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase em membrana plasmática sináptica. Os resultados mostraram que hipoxantina provoca uma redução significativa (45%) na atividade da enzima.

Com o objetivo de verificar se a inibição da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase causada pela hipoxantina sobre a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase era mediado pela formação de radicais livres, avaliamos o efeito de agentes antioxidantes, como GSH e trolox (vitamina E solúvel), sobre a atividade dessa enzima. A análise estatística demonstrou que GSH e trolox *per se* não alteraram a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase. Por outro lado, o GSH anula o efeito inibitório causado pela hipoxantina sobre a atividade da enzima. Já o trolox não foi capaz de prevenir a inibição enzimática causada por essa oxipurina.

Os presentes dados sugerem o envolvimento dos grupos SH presentes na  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase no mecanismo de inibição dessa enzima causada pela hipoxantina. Esses resultados estão acordo com estudos prévios realizados em nosso laboratório, os quais demonstraram que GSH é capaz de prevenir os efeitos inibitórios provocados pela homocisteína (STRECK et al., 2001) e prolina (FRANZON et al.,

2003) sobre a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase cerebral, indicando que os grupos sulfidril são essenciais para o funcionamento normal da enzima.

A fim de confirmar a participação do estresse oxidativo na inibição da atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase causada pela hipoxantina, investigamos o efeito in vitro da hipoxantina sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo. Os resultados mostraram que a hipoxantina provocou um aumento significativo (40%) na peroxidação lipídica (TBARS) e uma diminuição (22%) na capacidade antioxidante tecidual (TRAP) em estriado de ratos neonatos. Considerando que nossos resultados demonstrados anteriormente nesse trabalho mostram que o trolox não preveniu a inibição da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase causada pela hipoxantina e os resultados obtidos neste momento mostram que a hipoxantina aumenta TBARS, acreditamos que a concentração de trolox utilizada nesse estudo (1 mM) não foi suficiente para proteger as membranas celulares da peroxidação lipídica e por isso não preveniu a inibição da atividade da enzima pela hipoxantina.

Tendo em vista que estresse oxidativo é definido como a quebra da homeostase entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes, sugerimos que hipoxantina induza o estresse oxidativo cerebral. Nossos resultados estão de acordo com estudos prévios da literatura, os quais mostram que a hipoxantina aumenta a produção de radicais livres (CHAN et al., 1984, BECKMAN et al., 1987). Além disso, a peroxidação de lipídios, o conteúdo de glutatona oxidada e a atividade de uma das enzimas do metabolismo energético (aconitase) estão aumentados em estriado de

ratos com deficiência na enzima HGPRT, indicando a participação do estresse oxidativo na disfunção cerebral presente na doença (VISSER et al., 2002).

É possível que a inibição na atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase e/ou estresse oxidativo possam estar envolvidos nos mecanismos pelos quais as oxipurinas são neurotóxicas. Acreditamos que nossos resultados possam contribuir para a compreensão da disfunção neurológica encontrada em pacientes portadores da síndrome de Lesch-Nyhan.

#### **4.0 Conclusões**

1. As oxipurinas hipoxantina, xantina e ácido úrico *in vitro* inibem significativamente a atividade da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase em membrana plasmática sináptica de estriado de ratos neonatos.
2. Através da análise do gráfico de Lineweaver-Burk, observamos que hipoxantina inibe a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase de forma não competitiva com o substrato ATP.
3. Hipoxantina, xantina e ácido úrico apresentam um mecanismo similar de ação sobre a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase, sugerindo um mesmo sítio de ligação na enzima.



4. A pré-incubação do homogeneizado de estriado de ratos neonatos com hipoxantina, na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , inibiu significativamente a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase em membrana plasmática sináptica.
5. A glutatona, na concentração de 1.0 mM, preveniu o efeito inibitório da hipoxantina sobre a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase em membrana plasmática sináptica de estriado de ratos neonatos.
6. O trolox, na concentração de 1.0 mM, não foi capaz de prevenir a inibição da atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase causado pela hipoxantina em membrana plasmática sináptica de estriado de ratos neonatos.
7. Hipoxantina, *in vitro*, na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , provocou o aumento da peroxidação lipídica (TBARS) e a diminuição da capacidade antioxidante total não enzimática (TRAP) em homogeneizado de estriado de ratos neonatos.

## 5.0. Perspectivas

5.1. Verificar o efeito *in vitro* da hipoxantina sobre a atividade de algumas enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase) em estriado de ratos neonatos.

5.2. Verificar o efeito *in vitro* do Z-nucleotídeo, outra substância acumuladas na doença de Lesch-Nyhan, sobre a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase em estriado de ratos neonatos.

5.3. Verificar o efeito *in vitro* da hipoxantina sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em estriado de ratos neonatos.

5.4. Desenvolver um modelo experimental químico em ratos da doença de Lesch-Nyhan.

5.5 Estudar alguns parâmetros bioquímicos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase / metabolismo energético) e comportamentais (water maze e esquiwa inibitória) em ratos submetidos ao modelo experimental químico de Lesch-Nyhan.

## 6.0 Referências Bibliográficas:

- ABUJA, P.M. Ascorbate prevents prooxidant effects of urate in oxidation of human low density lipoprotein. FEBS Lett. 446: 305-308, 1999.
- ARYSTARKHOVA, E., WETZEL, R.K., ASINOVSKI, N.K., SWEADNER, K.J. The gamma subunit modulates Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> affinity of the renal Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase. J. Biol. Chem. 274: 33183-33185, 1999.
- AVROVA, N.F., VICTOROV, I.V., TYURIN, V.A., ZAKHAROVA, I.O., SOKOLOVA, T.V., ANDREEVA, N.A., STELMASCHUCK, E.V., TYURINA, Y.Y., GONCHAR, V.S. Inhibition of glutamate-induced intensification of free radical reactions by gangliosides: possible role in their protective effect in rat cerebellar granule cells and brain synaptosomes. Neurochem. Res. 23:945-952, 1998.
- BALIS, M.E. Uric acid metabolism in man. Adv. Clin. Chem. 18: 213-246, 1976.
- BAVARESCO, C.S., CALCAGNOTTO, T., TAGLIARI, B., LAMERS, M.L., WANNMACHER, C.M., WAJNER, M., WYSE, A.T.S. Brain Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibition induced by arginine administration is prevented by vitamins E and C. Neurochem Res. 28: 825-829, 2003.
- BEAL, M.F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. Free. Radic. Biol. Med. 32: 797 – 803, 2002.
- BECKMAN, J.S., LIU, T.H., HOGAN, E.L., FREEMAN, B.A., HSU, C.Y. Oxygen free radicals and xanthine oxidase in cerebral ischemic injury in the rat. Soc. Neurosci. Abstr. 13: 1498, 1987.
- 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.

- BERTORELLO, A.M. & KATZ, A.I. Regulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>- pump activity: pathways between receptors and effectors. NIPS. 10:253-259.
- BICKEL, H. Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. Enzyme. 38: 14-26, 1987.
- BLANCO, G., MERCER, R. Isozymes of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. Am. J. Physiol. 275: F633-F650, 1998.
- BOLDYREV, A.A. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. In: Science and Technology, vol. 17. pp. 5-120, 1985.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein –die binding. Anal. Biochem. 72: 248-254, 1976.
- BUHRDEL, P., KRUGER, W., HIRSCHBERG, K., WEHNERT, M. Adenine therapy in Lesch-Nyhan syndrome. Acta. Paediatr. Hung. 26: 327-333, 1985.
- BULL, M. & LaVECCHIO, F. Behavior therapy for a child with Lesch-Nyhan syndrome. Develop. Med. Child. Neurol. 20: 368-375, 1978.
- CALABRESI, P., DE MURTAS, M., PISANI, A., STEFANI, A., SANCESSARIO, G., - MERCURI, N.B., BERNARDI, G. Vulnerability of medium spiny striatal neurons to glutamate: role of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. Eur. J. Neurosci. 7: 1674-1683, 1995.
- CAPELLA, L.S., GEFE, M., SILVA, E.F., MORALES, M.M, AFFONSO-MITDIERI, O., LOPES, A.G., RUMJANEK, V.M., CAPELLA, M.A. Reduced glutathione protect cells from ouabain toxicity. Biochim. Biophys. Acta. 1526: 293-300, 2001.
- CHAN, P.H., SCHMIDLEY, J.W., FISHMAN, R.A., LONGAR, S.M. Brain injury, edema and vascular permeability changes induced by oxygen derived free radicals. Neurology 34: 315-320, 1984.

- CHAN, K.M., DELFERT, D., JUNGER, K.D. A direct colorimetric assay for  $\text{Ca}^{+}$  - stimulated ATPase activity. Anal. Biochem. 157: 375-380, 1986.
- CHEVILLARD, C., CÁRDENAS, M.L., 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, B.H. Oxygen, antioxidants and brain dysfunction. Yonsei. Med.J. 33: 1-10, 1993.
- CHOI, D.W., ROTHMAN, S.M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. Ann. Rev. Neurosci. 13: 171-182, 1990.
- CORNELIUS, F. & MAHMMOUD, Y.A. Functional modulation of the sodium pump: the regulatory proteins "fixit". News. Physiol. Sci. 18: 119-124, 2003.
- CORY, J.G. Metabolismo de nucleotídeos de purina e pirimidina. In: DEVLIN, T.M. (ed), Manual de Bioquímica com correlações clínicas, 4<sup>nd</sup> edn. São Paulo, Edgard Blucher LTDA, pp. 408-436, 1988.
- CRAMBERT, G., FUZESI, M., GARTY, H., KARLISH, S., GEERING, K. Phospholemman (FXD1) associates with  $\text{Na}^{+},\text{K}^{+}$ -ATPase and regulates its transport properties. PNAS. 99: 11476-11481, 2002.
- CRUZ, R., ALMAGUER-MELIAN, W., BERGADO – ROSADO, J.A. El glutati6n em la funci6n cognitiva y la neurodegeneraci6n. Rev. Neurol. 36: 877-886, 2003.
- CUSUMANO, F.J., PENNA, K.J., PANOSSIAN, G. Prevention of self-mutilation in patients with Lesch-Nyhan syndrome: review of literature. ASDC J. Dent. Child. 68: 175-178, 2001.
- CUTRUFO, C., BORTOT, L., GIANCHETTI, A., MANZINI, S. Differential effects of various xanthines on pentyletetrazole-induced seizures in rats: an EEG and behavioral study. Eur. J. Pharmacol. 3: 1-6, 1992.

DEAN, R.B. Theories of electrolyte equilibrium in muscle. Biol. Symp. 3:331-348, 1941.

DASHEIFF, R.M. Benzodiazepinic treatment for Lesch-Nyhan syndrome? Dev. Med. Child. Neurol. 22:101-102, 1980.

DeANTONIO, I., TORRES-JIMENEZ, R., VERDÚ-PÉREZ, A., PRIOR de CASTRO, C., GARCIA-PUIG, J. Tratamiento del síndrome de Lesch-Nyhan. Rev. Neurol. 35: 877-883, 2002.

DOBROTA, D., MATEJOVICOVA, M., KURELLA, E.G., BOLDYREV, A.A. Na/K-ATPase under oxidative stress: molecular mechanisms of injury. Cell Mol Neurobiol. 19(1):141-149, 1999.

EDWARDS, N.L., RECKER, D., FOX, I.H. Overproduction of uric acid in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency: contribution by impaired purine salvage. J. Clin. Invest. 63: 922-930, 1979.

ERECINSKA, M., SILVER, I.A. Ions and energy in mammalian brain. Prog. Neurobiol. 7: 21-29, 1994.

ESTERBAUER, H., CHESSMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4 – hydroxynonenal. Methods. Enzymol. 186:407-421, 1990.

FARDI, K., TOPOUZELIS, N., KOTSANOS, N. Lesch-Nyhan syndrome: a preventive approach to self-mutilation. Int. J. Paediatr. Dent. 13: 51-56, 2003.

FLOYD, R.A. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 222 :236-245, 1999.

FRANZON, R., LAMERS, M.L., STEFANELLO, F.M., WANNMACHER, C.D., WAJNER, M., WYSE, A.T.S. Evidence that oxidative stress is involved in the inhibitory effect of

- proline on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase activity in synaptic plasma membrane of rat hippocampus. Int. J. Devl. Neurosci. 21:303-307, 2003.
- GEYDE, A. Serotonin-gaba treatment is hypothesized for self-injury in Lesch-Nyhan syndrome. Med. Hypoth. 38: 325-328, 1992.
- GIUGLIANI, R. Erros inatos do metabolismo: uma visão panorâmica. Pediatria Moderna. 1: 29-40, 1988.
- GLOOR, S., ANTONICEK, H., SWEADNER, K.J., PAGLIUSI, S., FRANK, R., MOOS, M., SCHACHNER, M. The adhesion molecule on glial (AMOG) is a homologue of the beta subunit of the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase. J. Cell. Biol. 110 (1): 165-174, 1990.
- GLYNN, I.M. Annual review prize lecture: all hands to the sodium pump. J. Physiol. 462 1-30, 1993.
- GOLDEN, W.C., BRAMBRINK, A.M., TRAYSTMAN, R.J., MARTIN, L.J. Failure to sustain recovery of  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase function is a possible mechanism for striatal neurodegeneration in hypoxic – ischemic newborn piglets. Brain. Res. Mol. Brain. Res. 88 (1-2): 94-102, 2001.
- GRISAR, T. Glial and neuronal  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -pump in epilepsy. Ann. Neurol. 16 (Suppl.): 128-134, 1984.
- HABIBA, A., BALNCO. G., MERCER, R.W. Expression, activity and distribution of  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase subunits during in vitro neuronal induction. Brain Res. 875(1-2): 1-13, 2000.
- HAGBERG, H., ANDERSSON, P., LACAREWICZ, J., JACOBSON I., BUTCHER, S., SANDBERG, M. Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine and xanthine to tissue nucleotides and purines in rat striatum during transient ischemia. J. Neurochem. 49: 227-231, 1987.

- HALLIWELL, B. Free radicals, protein and DNA: oxidative damage versus redox regulation. Biochem. Soc. Trans. 24:1023-1027, 1996.
- HARKNESS, M.A., McCREANOR, G.M., WATTS, R.W. Lesch-Nyhan syndrome and its pathogenesis: purine concentrations in plasma and urine with metabolite profiles in CSF. J. Inherit. Metab. Dis. 11: 239-252, 1988.
- HASLER, U., CRAMBERT, G., HORISBERGER, J.D., GEERING, K. Structural and functional features of the transmembrane domain of the Na,K-ATPase beta subunit revealed by tryptophan scanning. J. Biol. Chem. 276(19):16356-16364, 2001.
- HENDERSON, J.F. Possible functions of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase and their relation to the biochemical pathology of the Lesch-Nyhan syndrome. Fed. Proc. 27: 1075-1077, 1968.
- HENVER, R.F., DUFF, R.S., WONG-RILEY, M.T.T. Coordination of ATP production and consumption in brain: parallel regulation of cytochrome oxidase and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Neurosci. Lett. 138: 188-192, 1992.
- HORTON, J.W. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. Toxicol. 189, 75 – 88, 2003.
- JINNAH, H.A. & FRIEDMANN, T. Lesch Nyhan disease and its variants. In: SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L., SLY, W.S., VALLE, D. (eds). The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, McGraw-Hill, New York, pp. 2537-2569, 2001.
- JINNAH, H.A., GAGE, F.H., FRIEDMANN, T. Animal models of Lesch-Nyhan syndrome. Brain Res. Bull. 25: 467-475, 1990.
- JONES, D.H., MATUS, A.I. Isolation of synaptic plasma membrane from brain by combined flotation-sedimentation density gradient centrifugation. Biochim. Biophys. Acta. 356: 276-287, 1974.



- JORGENSEN, P.L., HAKANSSON, K.O., KARLISH, S.J.D. Structure and Mechanism of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: Functional sites and their interactions. Annu. Rev. Physiol. 65: 817-849, 2003.
- KAPLAN, J.K. Biochemistry of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Annu. Rev. Biochem. 71: 511-535, 2002.
- KEMPSKI, O. Cerebral edema. Semin. Nephrol. 21: 303-307, 2001.
- KEYNES, R.D. Eletrogenic ion pump. Ann. N. Y. Acad. Sci. 227: 207-210, 1974.
- KISCH, S.J., FOX, I.H., KAPUR, B.M., LLOYD, K., HORNYKIEWICZ, O. Brain benzodiazepine receptor binding and purine concentration in Lesch-Nyhan syndrome. Brain. Res. 336: 117-123, 1985.
- KUMAR, A.R., KURUP, P.A.. Inhibition of a membrane Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity: a common pathway in central nervous system disorder. J. Assoc. Physicians. India. 50: 400-406, 2002.
- KURUP, R.K. & KURUP, P.A. Hypothalamic digoxin related membrane Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseinhibition and familial basal ganglia calcification. Neurosci. Res. 42: 35-44, 2002.
- KWON, H.J., WANG, I.K., AN, H.J., HAN, S.H., YANG, J.I., SHIN, HS., YOO, I.D., KANG, T.C., HO WON, M.H. Changes of glial Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (alpha1 subunit) immunoreactivity in the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. Brain. Res. 987 (2): 233-239, 2003.
- LEE, J.H., BERKOWITZ, R.J., CHOI, B.J. Oral self-mutilation in the Lesch-Nyhan syndrome. ASDC J. Dent. Child. 69: 66-69, 2002.
- LEES, G.J., LEHMANN, A., SANDBERG, M., HAMBERGER, A. The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibition in the rat hippocampus. Neurosci. Lett. 120: 159-162, 1993.

- LEES, G.J. Contributory mechanism in the causation of neurodegenerative disorders. Neurosci. 54: 287-322, 1993.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. Principles of Biochemistry, Worth Publishers, Inc. New York, 2<sup>nd</sup> Ed., 1995.
- LESCH, M. & NYHAN, W.L. A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. Am J Med. 36: 561, 1964.
- LICHSTEIN, D. & ROSEN, H. Endogenous digitalis-like Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibitors and brain function. Neurochem. Res. 26 (8-9): 971-978, 2001.
- LINGREL, J.B. and KUNTZWEILER, T. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. J. Biochem. Chem. 269: 196599-196662, 1994.
- LISSI, E., PASCUAL, C., AND DEL CASTILLO, M.D. Luminol luminescence induced by 2,2' -azo-bis (2-amidinopropane) thermolysis. Free Rad. Res. Comm. 17:299-311, 1992.
- LOEFFLER, D.A., CAMP, D.M., JUNEAU, P.L., HAREL, E., LEWITT, P.A. Purine-induced alterations of dopamine metabolism in rat pheochromocytoma PC12 cells. Brain. Res. Bull. 52: 553-558, 2000.
- LÓPEZ, O.L. & BECKER, J.T. Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Rev. Neurol. 35: 850-859, 2002.
- LOPEZ, L.B., QUINTAS, E.M., NOEL, F. Influence of development on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase expression: isoform-and tissue-depedency. Com. Biochem. Physiol. A. 131: 323-333, 2002.
- LOPINA, A.D. Interaction of Na,K-ATPase catalytic subunit with cellular proteins and other endogenous regulators. Biochemistry (Mosc). 66(10): 1122-31, 2001.

- LYHAN, W.L. The recognition of Lesch-Nyhan syndrome as an inborn error of purine metabolism. J. Inher. Metab. Dis. 20: 171-178, 1997.
- MA, M.H.Y., STACEY, N.C., CONNOLLY, G.P. Hypoxanthine impairs morphogenesis and enhances proliferation of a neuroblastoma model of Lesch Nyhan syndrome. J. Neurosci. Res. 63: 500-508, 2001.
- MALFATTI, C.R., ROYES, L.F., FRANCESCATO, L., SANABRIA, E.R., RUBIN, M.A., CAVALHEIRO, E.A., MELLO, C.F. Intrastratial methylmalonic acid administration induced convulsions and TBARS production, and alters Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the rat striatum and cerebral cortex. Epilepsia. 44: 761-767, 2003.
- MARES, P., KUBOVA, H., CZUCZWAR, S.J. Aminophylline exhibits convulsant action in rats during ontogenesis. Brain. Dev. 16: 296-300, 1994.
- MARK, R.J., LOVELL, M.A., MARKESBERY, W.R., UCHIDA, K., MATTSON, M.P. A role for 4 – hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid beta-peptide. J. Neurochem. 68: 255 – 264, 1997.
- MATEOS, F.A., PUIG, J.G., RAMOS, T.H., JIMÉNEZ, M.L., ROMERA, N.M., GONZALEZ, A.G. Prenatal diagnosis of Lesch-Nyhan syndrome by purine analysis of amniotic fluid and cordocentesis. Adv. Exp. Med. Biol. 309B: 47-50, 1991.
- MEISTER, A., AND ANDERSON, M.E. Glutathione. Annu. Rev. Biochem. 52:711-760, 1983.
- MORIWAKI, Y., YAMAMOTO, T., HIGASHINO, K. Enzymes involved in purine metabolism – a review of histochemical localization and functional implications. Histol. Histopathol. 14: 1321-1340, 1999.

- NIETO, F.J. IRIBARREN, C., GROSS, M.D., COMSTOCK, G.W., CUTLER, R.G. Uric Acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis? Atherosclerosis. 148: 131-139, 2000.
- NOMIKOS, G.G., ZIS, A.P., DAMSMA, G., FIBIGER, H.C. Electroconvulsive shock increases interstitial concentrations of uric acid in the rat brain. Brain. Res. 10: 50-56, 1994.
- NYHAN, W.L. The Lesch-Nyhan syndrome. Annu. Rev. Med. 24:41-60, 1973.
- NYHAN, W.L. The Lesch-Nyhan syndrome. Dev. Med. Chil. Neurol. 20: 376-380, 1978.
- OLSON, L., HOULIHAN, D. A review of behavioral treatments used for Lesch-Nyhan syndrome. Behav. Modific. 24:202-222, 2000.
- PALMOUR, R.M., HESHKA, T.W., ERVIN, F.R. Hypoxanthine accumulation and dopamine depletion in Lesch-Nyhan disease. Adv. Exp. Med. Biol. 253: 165-172, 1989.
- PARKS, D.A., GRANGER, D.N. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. Acta. Physiol. Scand. 548: 87-99, 1986.
- PONTES, Z.L., OLIVEIRA, L.S., BAVARESCO, C.S., DUTRA-FILHO, C.S., WAJNER, M., WANNMACHER, C.M.D., WYSE, A.T.S. Proline administration decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the synaptic plasma membrane from cerebral cortex of rats. Metab. Brain. Res. 26: 1321-1326, 1999.
- PU, H.X., SCANZANO, R., BLOSTEIN, R. Distinct regulatory effects of the Na,K-ATPase gamma subunit. J Biol Chem. 277(23):20270-20276, 2002.
- PUIG, J.G., JIMENEZ, M.L., MATEOS, F.A., FOX, I.H. Adenine nucleotide turnover in hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase: evidence for an increased contribution of purine biosyntheses de novo. Metabolism. 38: 410-418, 1989.

- RAVIKUMAR, A., ARUN, P., DEVI, K.V., AGUSTINE, J., KURUP, P.A. Isoprenoid pathway and free radical generation and damage in neuropsychiatric disorders. *Indian. J. Exp. Biol.* 38: 438-446, 2000.
- RENKAWEK, K., RENIER, W.O., DE PONT, J.J., VOEGELS, O.J., GABREELS, F.J. Neonatal status convulsivus, spongiform encephalopathy and low activity of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the brain. *Epilepsy.* 33: 58-64, 1992.
- REZNICK, A.Z., AND PACKER, L. Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. In: Poli, G., Albano, E., and Dianzani, M.U. (eds), *Free Radicals: from Basic Science to Medicine*, Birkhäuser Verlag, Basel. pp. 425-437, 1993.
- RIJKSEN, G., STAAL, G.E.J., VAN DER VLIST, M.J.M., BEERNER, F.A., TROOST, J., GUTENSOHN, W., VAN LAARHOVEN, J.P.R.M., DE BRUYN, C.H.M.M. 1981. Partial hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase deficiency with full expression of the Lesch – Nyhan syndrome. *Hum. Gen.* 57:39-47.
- ROBEY, K.L., RECK, J.F., GIACOMINI, K.D., BARABAS, G., EDDEY, G.E. Modes and patterns of self-mutilation in persons with Lesch-Nyhan disease. *Dev. Med. Child. Neurol.* 45: 167-171, 2003.
- ROSENBLOOM, R.M., HENDERSON, J.F., CALDWELL, I.C., KELLEY, W.N., SEEGMILLER, J.E. Inherited disorder of purine metabolism. *JAMA.* 202:175-177, 1967.
- ROSSITER, B.J.F. & CASKEY, C.T. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency: Lesch-Nyhan syndrome and gout. In: SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L., SLY, W.S., VALLE, D. (eds), *The Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, pp. 1679-1706, 1995

- SCHMIDT, H., SIEMS, W.G., GRUNE, T., GRAUEL, E.L. Concentration of purine compounds in the cerebrospinal fluid of infants suffering from sepsis, convulsions and hydrocephalus. J. Perinat. Med. 23: 167-174, 1995.
- SCHULL, G.E., SCHWARTZ, A. & LINGREL, J.B. Amino-acid sequence of the catalytic subunit of the (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase deduced from complementary DNA. Nature. 316: 691-695, 1985.
- SCHULZ, J.B., LINDENAU, J., SEYFRIED, J., DICHGANS, J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. Eur. J. Biochem. 267: 4904 – 4911, 2000.
- SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L., SLY, W.S. and VALLE, D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. McGraw-Hill, Inc., New York, 8th Ed., 2001.
- SEEGMILLER, J.E, ROSENBLOOM, F.M., KELLEY, W.N. Enzyme defect associated with sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis. Science. 155: 1682, 1967.
- SEEGMILLER, J.E. Inherited deficiency of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase in X-linked. Adv. Hum. Genet. 6: 75-163, 1976.
- SIEMS, W.G., HAPNER, S.J., VAN KUIJK, F.J. 4 – hydroxynonenal inhibits Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Free. Rad. Biol. Med. 20: 215-223, 1996.
- SIGSTROM, L. Characteristics of active sodium and potassium transport in erythrocytes in children with different stages of symptomatic uremia. Acta. Pediatr. Scand. 70: 361-368, 1981.
- SILVA, C.G., PAROLO, E., STRECK, E.L., WAJNER, M., WANNMACHER, C.M.D., WYSE, A.T.S. In vitro inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity from rat cerebral cortex by guanidino compounds accumulating in hyperargininemia. Brain Res. 838: 78-84, 1999.

- SKOU, J.C. and ESMANN, M. The Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. J. Bioenerg. Biomembr., 24:249-261, 1992.
- STELMASHOOK, E.V., WEIH, M., ZOROV, D., VICTOROV, I., DIRNAGL, U., ISAEV, N. Short-term block of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase in neuro-glial cell cultures of cerebellum induces glutamate dependent damage of granule cells. FEBS Lett. 456: 41-44, 1999.
- STRECK, E.L., ZUGNO, A.I., TAGLIARI, B., FRANZON, R., WANNMACHER, C.M.D., WAJNER, M., WYSE, A.T.S. Inhibition of rat brain Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity induced by homocysteine is probably mediated by oxidative stress. Neurochem. Res. 26: 195-200, 2001.
- STRECK, E.L., ZUGNO, A.I., TAGLIARI, B., WANNMACHER, C.M.D., WAJNER, M., WYSE, A.T.S (a). Inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity by the metabolites accumulated in homocystinuria. Metab. Brain. Dis. 17: 83-90, 2002.
- STRECK, E.L., ZUGNO, A.I., TAGLIARI, B., WANNMACHER, C.M.D., WAJNER, M., WYSE, A.T.S (b). On the mechanism of the inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity caused by homocystein. Int. J. Dev. Neurosci. 20: 77-81, 2002.
- SWEADNER, K.J. The sodium pump: recent developments. In: KAPLAN, J.H., DE WEER, P. eds. Society of General Physiologists Series, Vol. 46 (Part I). Rockefeller University Press, New York, pp. 63-76, 1991.
- SWEETMAN, L. Urinary and cerebrospinal fluid oxypurine levels and allopurinol metabolism in the Lesch-Nyhan syndrome. Fed. Proc. 27: 1055-1059, 1968.
- THERIEN, A.G., GOLDSHLEGER, R., KARLISH, S.J.D., BLOSTEIN, R. Tissue-specific distribution and modulatory role of the  $\gamma$  subunit of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. J. Biol. Chem. 272: 32623-32634, 1997.

- TESTA, I., RABINI, R.A., CORVETTA, A., DANIELI, G. Decreased Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in erythrocyte membrane from rheumatoid arthritis patients. Scand. J. Rheumatol. 16: 301-305, 1987.
- TICKU, M.K., BURCH, T. Purine inhibition of [<sup>3</sup>H]- gamma -aminobutyric acid receptor binding to rat brain membranes. Biochem. Pharmacol. 29: 1217-1220, 1980.
- TORRES-JIMENEZ, R., MATEOS-ANTÓN, F., ARCAS-MARTINEZ, J., PASCUAL-CASTROVIEJO, I., GARCIA-PUIG, J. Fisiopatología de las manifestaciones neurológicas en la deficiencia de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa. Rev. Neurol. 27: 1050-1054, 1998.
- TSAKIRIS, S., DELICONSTANTINOS, G. Influence of phosphatidylserine on (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-stimulated ATPase and acetylcholinesterase activities of dog brain synaptosomal plasma membranes. Biochem. J. 22: 301-307, 1984.
- VASARHELYI, B., SALLAY, P., BALOG, E., REUSZ, G., TULASSAY, T. Altered Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> ATPase activity in uraemic adolescents. Acta. Pediatr. 85: 912-922, 1996.
- VASILETS, L.A. & SCHWARZ, W. Structure-function relationships of cation binding in the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Biochim. Biophys. Acta. 1154: 201-222, 1993.
- VELDHUIS, W.B., VAN DER STEL, M., DELMAS, F., GILLET, B., VELDNIK, G.A., VLIEGENTHART, J.F., NICOLAY, K., BAR, P.R. In vivo excitotoxicity induced by ouabain, a Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibitor. J. Cereb. Blood. Flow. Metab. 23: 62-74, 2003.
- VISSER, J.E., BAR, P.R., JINNAH, H.A. Lesch-Nyhan disease and the basal ganglia. Brain Res. Bull. 32: 449-475, 2000.
- VISSER, J.E., SMITH, D.W., MOY, S.S., BREESE, G., FRIEDMANN, T., ROTHSTEIN, J.D., JINNAH, H.A. Oxidative stress and dopamine deficiency in genetic mouse model of Lesch-Nyhan disease. Brain. Res. Dev. Brain. Res. 28: 127-139, 2002.



- WANG, X.Q., XIAO, A.Y., SHELINE, C., HYRC, K., YANG, A., GOLDBERG, M.P., CHOI, D.W., PING, Y.S. Apoptotic insults impair Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity as a mechanism of neuronal death mediated by concurrent ATP deficiency and oxidant stress. J. Cell. Sci. 116: 2099-2110, 2003.
- WEIR, C.J., MUIR, S.W., WALTERS, M.R., LEES, K.R. Serum urate as a independent predictor of poor outcome and future vascular events after acute stroke. Stroke. 34: 1951-1957, 2003.
- WESTERNINK, B.H.C., DAMSMA, G., VRIES, J.B. Effect of ouabain applied by intrastriatal microdialysis on the in vivo release of dopamine, acetylcholine, and amino acids in the brain of conscious rats. J. Neurochem. 52: 705-712, 1990.
- WYSE, A.T.S., WAJNER, M., BRUSQUE, A.M., WANNMACHER, C.M.D. Alanine reverses the inhibitory effect of phenylalanine and its metabolites on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of rats. Biochem. Soc. Trans. 23, 227S, 1995.
- WYSE, A.T.S., WAJNER, M., WANNMACHER, C.M.D. Kinetics of alanine reversal on the inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity by phenylalanine and phenyllactate in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats. Med. Sci. Res. 26: 141-143, 1998.
- WYSE, A.T.S., NORILER, M.E., BORGES, L.F., FLORIANO, P.J., SILVA, C.G., WAJNER, M., WANNMACHER, C.M.D. Alanine prevents the decrease of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in experimental phenylketonuria. Metab. Brain. Dis. 14: 95-101, 1999.
- WYSE, A.T.S, STRECK, E.L., WORM, P., WAJNER, M., RITTER, F., NETTO, C.A. Preconditioning prevents the inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity after brain ischemia. Neurochem. Res. 25: 969-973, 2000.

- WYSE, A.T.S., BAVARESCO, C.S., BANDINELLI, C., STRECK, E.L. FRANZON, R., DUTRA-FILHO, C.S., WAJNER, M. Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME prevents the decrease of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in midbrain of rats subjected to arginine administration. Neurochem. Res. 26: 515-520, 2001.
- WYSE, A.T.S, ZUGNO, A.I., STRECK, E.L., MATTE, C., CALCAGNOTTO, T., WANNMACHER, C.D., WAJNER, M. Inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. Neurochem. Res. 27: 1685-1689, 2002.
- XIAO, A.Y., WEI, L., XIA, S., ROTHMAN, S., YU, S.P (a). Ionic mechanism of ouabain-induced concurrent apoptosis and necrosis in individual cultured cortical neurons. J. Neurosci. 22: 1350-1362, 2002.
- XIAO, A.Y., WANG, X.Q., YANG, A., YU, S.P (b). Slight impairment of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase synergistically aggravates ceramide and beta-amyloid induced apoptosis in cortical neurons. Brain. Res. 955 (1-2): 253-259, 2002.
- YU, S. P. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: the new face of an older player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. Biochem Pharmacol. 66: 1601-1609, 2003.
- YU, Z.F., BUCE-KELLER, A.J., GOODMAN, Y., MATTSON, M.P. Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture and against focal ischemic brain injury in vivo. J. Neurosci. Res. 53: 613-625, 1998.
- ZUGNO, A.I., STEFANELLO, F.M., STRECK, E.L., CALCAGNOTTO, T., WANNMACHER, C.M.D., WAJNER, M., WYSE, A.T.S. Inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat striatum by guanidinoacetate. Int. J. Devl. Neurosci. 21: 183-189, 2003.