

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -
BIOQUÍMICA

EFEITO *IN VITRO* DE QUINURENINAS SOBRE VÁRIOS
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÓRTEX
CEREBRAL DE RATOS JOVENS

GUILHIAN LEIPNITZ

ORIENTADOR: Prof. Dr. MOACIR WAJNER

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

Porto Alegre, 2006.

***“Com talento comum e
perseverância extraordinária,
todas as coisas são possíveis.”***

Thomas Buxton

***Novamente aos meus pais,
meus exemplos de vida.***

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul que, apesar das dificuldades, proporciona aos seus alunos um ensino de altíssima qualidade.

A todos os meus colegas de trabalho.

Aos Professores Dutra e Ângela pelo convívio e ajuda.

Ao Professor Clóvis por toda a sabedoria e exemplo de vida.

Ao Augusto, Déia, Xuxa, Cuca e Carolzinha, não necessariamente nessa ordem, meus colegas e, principalmente, grandes amigos para todas as horas.

Ao meu parceiro Thiaguinho, grande amigo desde a faculdade, por todas as risadas.

À minha querida amiga Aline, pessoa extraordinária.

Às bolsistas e amigas Anelise, Ana Laura, Juli, Carol e Vanessa.

Ao Vilson, grande figuraça, por toda a alegria.

À Rita pela grande amizade.

Aos meus colegas de pós-graduação Patrícia e Gustavo pelo grande convívio.

À minha querida bolsista Cris, por toda a ajuda e, principalmente, por ser uma grande amiga.

Ao Denis e à Letícia, pessoas incríveis, que me deram muito apoio e toda a ajuda da qual precisava na Austrália.

Ao Rafa, exemplo de profissional e de vida, por toda a amizade e pelas histórias malucas.

Ao César, pai do ano e uma das pessoas mais prestativas que já conheci em toda a minha vida, pela amizade.

À Karina Scussiato, cerejinha, amiga especial dentro do laboratório.

À Lali, mi madresita, que é uma pessoa especial e é realmente uma mãe pra mim e a quem vou precisar agradecer durante toda a minha vida pela ajuda profissional e pessoal.

Ao Prof. Moacir, exemplo de profissional e paizão do laboratório, por toda a ajuda, compreensão, broncas e elogios.

A todos os familiares de minha namorada.

A todos os meus familiares queridos, tios, tias, avós, primos e até ao Guma, por toda a compreensão e convívio.

À minha tia Vivi, de quem tenho muitas saudades, por tudo.

Em especial aos meus pais e aos meus irmãos, a quem devo tudo em minha vida, por todo o amor e carinho.

À minha amada namorada Kari, por toda a ajuda durante o mestrado (ela foi responsável direta por esse trabalho) e, obviamente, pelo amor e carinho incondicionais.

A Deus, pela proteção e pelas pessoas especiais que colocou em minha vida.

ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
LISTA ABREVIATURAS.....	3
I INTRODUÇÃO.....	4
I. 1 Metabolismo do Triprofano.....	4
I. 2 Atividades Biológicas das Quinureninas.....	5
I. 3 Doenças Neurodegenerativas e Quinureninas.....	9
I. 4 Radicais Livres.....	12
I. 5 Lipoperoxidação.....	13
I. 6 Defesas Antioxidantes.....	14
I. 7 Estresse Oxidativo.....	15
I. 8 Estresse Oxidativo e Doenças Neurodegenerativas.....	16
II OBJETIVO.....	18
II. 1 Geral.....	18
II. 2 Específicos.....	18
III Material e Métodos.....	20
III. 1 Reagentes.....	20
III. 2 Reagentes utilizados.....	20
III. 3 Equipamentos e outros materiais.....	21
III. 4 Animais.....	22
III. 5 Preparação da amostra e incubação.....	22
III. 6 Manutenção da linhagem celular.....	22
III. 7 Estudos Morfológicos.....	23
III. 8 Preparação dos homogeneizados de células.....	23
III. 9 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)...	23
III. 10 Quimiluminescência.....	24
III. 11 Medida das concentrações de glutathiona reduzida (GSH).....	24
III. 12 Oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA).....	25
III. 13 Medida da oxidação da 2-deoxi-D-ribose.....	25
III. 14 Medida da redução de radicais derivados	

do 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP).....	26
III. 15 Potencial antioxidante total (TRAP).....	26
III. 16 Reatividade Antioxidante Total (TAR).....	27
III. 17 Medida de proteínas.....	28
III. 18 Análise estatística.....	28
IV RESULTADOS.....	29
IV. 1 Efeito <i>in vitro</i> dos metabólitos da via das quinureninas sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens.....	29
IV. 1. 1 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens.....	29
IV. 1. 2 Efeito <i>in vitro</i> da quinurenina (Kyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens.....	33
IV. 1. 3 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HAA) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens.....	36
IV. 1. 4 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico (AA) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens.....	40
IV. 1. 5 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (QA) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens.....	43
IV. 2 Efeito <i>in vitro</i> dos metabólitos da via das quinureninas sobre a quimiluminescência em córtex cerebral de ratos jovens.....	46
IV. 2. 1 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre a quimiluminescência em córtex cerebral de ratos jovens.....	46
IV. 2. 2 Efeito <i>in vitro</i> da quinurenina (Kyn) sobre a quimiluminescência em córtex cerebral de ratos jovens.....	47
IV. 2. 3 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HAA)	

sobre a quimiluminescência em córtex cerebral de ratos jovens.....	48
IV. 2. 4 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico (AA) sobre a quimiluminescência em córtex cerebral de ratos jovens.....	49
IV. 2. 5 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (QA) sobre a quimiluminescência em córtex cerebral de ratos jovens.....	50
IV. 3 Efeito <i>in vitro</i> dos metabólitos da via das quinureninas sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em córtex cerebral de ratos jovens.....	53
IV. 3. 1 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em córtex cerebral de ratos jovens.....	53
IV. 3. 2 Efeito <i>in vitro</i> da quinurenina (Kyn) sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em córtex cerebral de ratos jovens.....	54
IV. 3. 3 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HAA) sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em córtex cerebral de ratos jovens.....	55
IV. 3. 4 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico (AA) sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em córtex cerebral de ratos jovens.....	56
IV. 3. 5 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (QA) sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em córtex cerebral de ratos jovens.....	57
IV. 4 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) e da quinurenina (Kyn) sobre a oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) em córtex cerebral de ratos jovens.....	60
IV. 4. 1 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre a oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) em córtex cerebral de ratos jovens.....	60
IV. 4. 2 Efeito <i>in vitro</i> da quinurenina (Kyn) sobre a oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) em córtex cerebral de ratos jovens.....	62
IV. 5 Efeito dos metabólitos da via das quinureninas sobre a	

oxidação da 2-deoxi-D-ribose.....	63
IV. 5. 1 Efeito da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre a oxidação da 2-deoxi-D-ribose.....	63
IV. 5. 2 Efeito da quinurenina (Kyn) sobre a oxidação da 2-deoxi-D-ribose.....	65
IV. 5. 3 Efeito do ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA) sobre a oxidação da 2-deoxi-D-ribose.....	66
IV. 5. 4 Efeito do ácido antranílico (AA) sobre a oxidação da 2-deoxi-D-ribose.....	67
IV. 6 Efeito da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) e do ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA) sobre os radicais peroxila derivados do 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP).....	68
IV. 6. 1 Efeito da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre os radicais peroxila gerados através da decomposição térmica do 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP).....	68
IV. 6. 2 Efeito do ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA) sobre os radicais peroxila gerados através da decomposição térmica do 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP).....	70
IV. 7 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (QA) sobre o potencial antioxidante total (TRAP) em córtex cerebral de ratos jovens.....	71
IV. 8 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em córtex cerebral de ratos jovens.....	72
IV. 9 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina sobre a oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) e sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de ácido glutárico (GA) em córtex cerebral de ratos jovens.....	73
IV. 9. 1 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre a oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA)	

na presença de ácido glutárico (GA) em córtex cerebral de ratos jovens.....	73
IV. 9. 2 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de ácido glutárico (GA) em córtex cerebral de ratos jovens.....	75
IV. 10 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de 1 mM de ácido glutárico (GA) e 1 mM de ácido 3-hidroxiglutárico (HGA) ou na presença de GA, HGA e ácido quinolínico (QA) em córtex cerebral de ratos jovens.....	76
IV. 11 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de ácido quinolínico (QA) em córtex cerebral de ratos jovens.....	78
IV. 12 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em homogeneizado de células C6 cultivadas em diferentes tempos de exposição (1-48 horas).....	79
IV. 12. 1 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de células C6 cultivadas em diferentes tempos de exposição (1-48 horas).....	79
IV. 12. 2 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em homogeneizado de células C6 cultivadas em diferentes tempos de exposição (1-48 horas).....	81
IV. 12. 3 Efeito da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre a morfologia de células C6 cultivadas em um tempo de exposição de 48 horas.....	82

V DISCUSSÃO.....	83
VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
ANEXO I.....	111
ANEXO II.....	114
LISTA DE FIGURAS.....	116

RESUMO

A via das quinureninas é a principal rota de degradação do aminoácido triptofano. Os metabólitos dessa via, comumente chamados de quinureninas, estão envolvidos em vários processos fisiológicos e patológicos e, recentemente, algumas quinureninas foram relacionadas à fisiopatologia de várias doenças neurodegenerativas. Tendo em vista que dados da literatura são contraditórios no que se refere à geração de espécies reativas a partir de algumas quinureninas e considerando que as concentrações de alguns desses metabólitos estão elevadas em várias doenças neurodegenerativas, este trabalho teve por objetivo investigar os efeitos *in vitro* de alguns intermediários da via das quinureninas, particularmente a 3-hidroxiquinurenina (3HKyn), a quinurenina (Kyn), o ácido 3-hidroxi-antranílico (3HAA), o ácido antranílico (AA) e o ácido quinolínico (QA) sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos de 30 dias de idade. Verificamos que a 3HKyn e o 3HAA diminuíram as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e a quimiluminescência em córtex cerebral de ratos jovens, o que indica um efeito antioxidante desses compostos, ao passo que a Kyn e o AA não alteraram os parâmetros de lipoperoxidação. Por outro lado, o QA aumentou a peroxidação lipídica nesta estrutura cerebral por aumentar significativamente as medidas de TBA-RS e quimiluminescência. Além disso, se pode verificar uma prevenção significativa da oxidação da GSH causada pelo 3HAA, enquanto o QA, na presença de íon ferroso e ácido ascórbico, diminuiu significativamente as concentrações de glutatona reduzida, o que indica que esse efeito seja mediado por radicais hidroxila gerados através da reação de Fenton. Já a 3HKyn, a Kyn e o AA não alteraram significativamente as concentrações de GSH. Também se verificou que a 3HKyn diminuiu a oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína, além de mostrar a propriedade de seqüestrar radicais peroxila e hidroxila. Por outro lado, o 3HAA somente seqüestrou radicais peroxila, sugerindo que a estrutura *orto*-aminofenólica é essencial para o composto possuir propriedades antioxidantes. Com o objetivo de verificar se o tempo de exposição à 3HKyn alterava a sua atividade antioxidante, determinamos a reatividade antioxidante total (TAR) e os valores de TBA-RS em células C6 cultivadas de glioma de ratos ao longo de 48 h na ausência (controle) ou presença de 3HKyn. Os resultados demonstraram um aumento da TAR e uma diminuição das TBA-RS pela 3HKyn em tempos curtos de exposição (1-6 horas), sendo que o metabólito não alterou significativamente esses parâmetros em tempos maiores de exposição, sugerindo uma diminuição da capacidade antioxidante da 3HKyn ao longo do tempo. Também verificamos uma diminuição do potencial antioxidante total (TRAP) e da TAR pelo QA em homogeneizado de córtex cerebral. Finalmente, foi evidenciado que a 3HKyn, na concentração de 100 µM, foi capaz de prevenir os efeitos tóxicos causados pelo QA e pelo ácido glutárico (GA). O GA é a principal neurotoxina que se encontra acumulada na acidemia glutárica tipo I. Em resumo, nossos resultados sugerem um efeito antioxidante da 3HKyn e do 3HAA e um efeito pró-oxidante do QA *in vitro* em córtex cerebral de ratos jovens. As alterações provocadas pelas várias quinureninas foram obtidas nas concentrações de 10, 100 e 500 µM. Embora não saibamos as concentrações dessas substâncias em doenças neurodegenerativas em que eles se acumulam, é

possível que, em uma situação *in vivo*, a produção de substâncias antioxidantes através da rota das quinureninas poderia contrabalançar os efeitos tóxicos causados por outros metabólitos como o QA.

ABSTRACT

Kynurenines are the main products of tryptophan metabolism. These metabolites have been shown to be involved in several physiological and pathological processes, and recently some kynurenines were shown to be involved in the pathophysiology of some neurodegenerative disorders. Considering that a large body of evidence already demonstrated the generation of reactive species by some kynurenines and that the concentrations of some kynurenines are altered in neurodegenerative disorders, in the present study we investigated the *in vitro* effect of some kynurenines, namely 3-hydroxykynurenine (3HKyn), kynurenine (Kyn), 3-hydroxyanthranilic acid (3HAA), anthranilic acid (AA) and quinolinic acid (QA) on some important parameters of oxidative stress in cerebral cortex of 30-day-old rats. The effects of 3HKyn on thiobarbituric-acid reactive substances (TBA-RS) and total antioxidant reactivity (TAR) were also evaluated in C6 glioma cells. We verified that 3HKyn and 3HAA diminished the TBA-RS and the chemiluminescence, indicating an antioxidant effect of these metabolites, whereas Kyn and AA did not alter these lipid peroxidation parameters. On the other hand, QA induced an increase on TBA-RS and chemiluminescence in cerebral cortex of young rats. It was also verified that only 3HAA significantly prevented the GSH oxidation, since it was found increased levels of GSH in the presence of 100 μ M 3HAA, when compared to control, whereas QA significantly diminished the reduced glutathione levels in the presence of ferrous ion and ascorbate, suggesting that the effect was mediated by hydroxyl radicals generated through the Fenton reaction. 3HKyn, Kyn and AA did not provoke any effect on the GSH levels. Furthermore, 3HKyn diminished the 2, 7-dichlorofluorescein diacetate oxidation and was able to scavenge peroxy and hydroxyl radicals, whereas 3HAA only showed effect on the peroxy radicals, suggesting that the *ortho*-aminophenolic structure is essential for the antioxidant properties of these compounds. When C6 cells were exposed to 3HKyn for 1-48 hours, the total antioxidant reactivity (TAR) values were significantly increased at all incubation periods, although this enhancement decreased along time. Furthermore, TBA-RS was significantly reduced by 3HKyn only at 1 and 6 hour incubation, but not at longer exposure times. QA also diminished the non-enzymatic antioxidant defenses, indicating that QA induces oxidative stress in rat brain. Finally, the co-incubation of 3HKyn with QA or GA, which is the major neurotoxin accumulated in glutaric academia type I, prevented the toxic effects caused by these metabolites. In conclusion, the data suggest an antioxidant effect of some tryptophan metabolites, particularly 3HKyn and 3HAA, whereas QA has opposite effect. Although the brain levels of the kynurenine metabolites in the neurodegenerative disorders are not known, it is possible that an increase in the production of kynurenine intermediates with antioxidant properties could compensate the toxic effects caused by other metabolites such as QA.

LISTA DE ABREVIATURAS

3HAA	ácido 3-hidroxiantranílico
3HKyn	3-hidroxiquinurenina
8-OHdGA	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
AA	ácido antranílico
ABAP	2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano)
DCF	2, 7-diclorofluoresceína
DCFH-DA	diacetato de 2,7-diclorofluoresceína
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
Fe II	íon ferroso
Fe III	íon férrico
GABA	ácido γ -aminobutírico
GSH	glutathiona reduzida
GSSG	glutathiona oxidada
IDO	indoleamina 2, 3-dioxigenase
Kyn	quinurenina
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LOOH	hidroperóxido lipídico
NAD⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo
QA	ácido quinolínico
LOO•	radical peroxila
TAR	reatividade antioxidante total
TBA-RS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TDO	triptofano 2, 3-dioxigenase
TRAP	potencial antioxidante total

I. INTRODUÇÃO

I. 1 Metabolismo do Triptofano

O triptofano é um aminoácido essencial para os seres humanos e, portanto, deve ser obtido da dieta. A principal rota de degradação do triptofano é a rota das quinureninas, a qual leva à síntese do ácido nicotínico (niacina), precursor de uma importante coenzima de reações biológicas, a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺). A via das quinureninas também representa a rota pela qual o triptofano é degradado via glutarato, fornecendo energia na forma de acetil-CoA (Figura I.1).

A rota das quinureninas é encontrada em células de linhagem monocítica, incluindo macrófagos, microglia e em astrócitos. Entretanto, os astrócitos não possuem a enzima quinurenina 3-hidroxilase, a qual converte quinurenina a 3-hidroxiquinurenina. Portanto, em condições fisiológicas, os astrócitos não produzem ácido quinolínico (QA). Contudo, em situações patológicas, sabe-se que o astrócito é estimulado, produzindo quinurenina em grandes quantidades, a qual pode ser captada por macrófagos ou microglia, havendo então a produção de QA (GUILLEMIN et al., 2001).

O fluxo através da rota das quinureninas é limitado no cérebro pela primeira enzima, a indoleamina 2, 3 dioxigenase (IDO; [EC 3.7.1.3]) ou triptofano 2, 3 dioxigenase no fígado (TDO; [EC 1.13.11.11]), a qual utiliza ânion superóxido como cofator. A IDO/TDO, bem como a quinurenina 3-monooxigenase, a antranilato 3-monooxigenase e a 3-hidroxi-antranilato 3, 4-dioxigenase requerem oxigênio para sua atividade catalítica, e a última ainda requer ferro na forma de íon ferroso (SAITO et al., 1996). A IDO é induzida pela citocina pró-inflamatória interferon γ , a qual aumenta sua atividade e, conseqüentemente, o fluxo através da via das quinureninas. Dessa forma, na presença de vírus, bactérias ou endotoxinas, há produção de interferon γ , o qual estimula a síntese de prostaglandinas, que também são indutoras da atividade da IDO. Também foi demonstrado que, como conseqüência de um processo inflamatório, o ânion

superóxido é liberado e utilizado por essa enzima, o que também contribui para a conversão de triptofano a L-quinurenina (HAYASHI, 1992).

O catabolismo do triptofano através da via das quinureninas tem levantado bastante interesse nos últimos anos, visto que vários intermediários dessa via apresentam importantes atividades biológicas.

I. 2 Atividades Biológicas das Quinureninas

Os intermediários da via das quinureninas desempenham importante papel em algumas funções fisiológicas, tais como no comportamento, no sono, na termoregulação e na gestação (STONE et al, 1993; CURZON, 1996). Essa rota também está bastante relacionada à resposta inflamatória, sendo que seus intermediários são capazes de induzir a expressão de várias citocinas, quimiocinas e seus receptores em astrócitos (GUILLEMIN et al., 2000), promovendo a inflamação. Por outro lado, nos últimos anos, estes compostos têm sido relacionados à fisiopatologia de várias doenças neurodegenerativas.

Inicialmente, o QA era considerado apenas um intermediário da rota das quinureninas sem nenhuma importância fisiológica. A importância fisiológica e farmacológica do QA foi reconhecida com a descoberta de que esse metabólito é um agonista de receptores glutamatérgicos, possuindo uma relativa seletividade pelo receptor do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (STONE et al., 1993; STONE e PERKINS, 1981; TSUZUKI et al., 1989; KIM e CHOI, 1987; SCHWARCZ et al., 1983). A ativação dos receptores glutamatérgicos é importante para várias funções cerebrais tais como cognição, aprendizado e memória e na formação de redes neurais durante o desenvolvimento (COLLINGRIDGE e LESTER, 1989, IZQUIERDO et al., 1994; OZAWA et al., 1998). Entretanto, a excessiva ativação de receptores glutamatérgicos pode causar morte neuronal. Olney et al. (1980) denominaram essa condição de excitotoxicidade. Assim, foi demonstrada a ocorrência de uma extensa lesão neuronal após injeções intra-estriatais e intra-hipocampais do QA (SCHWARCZ et al., 1983).

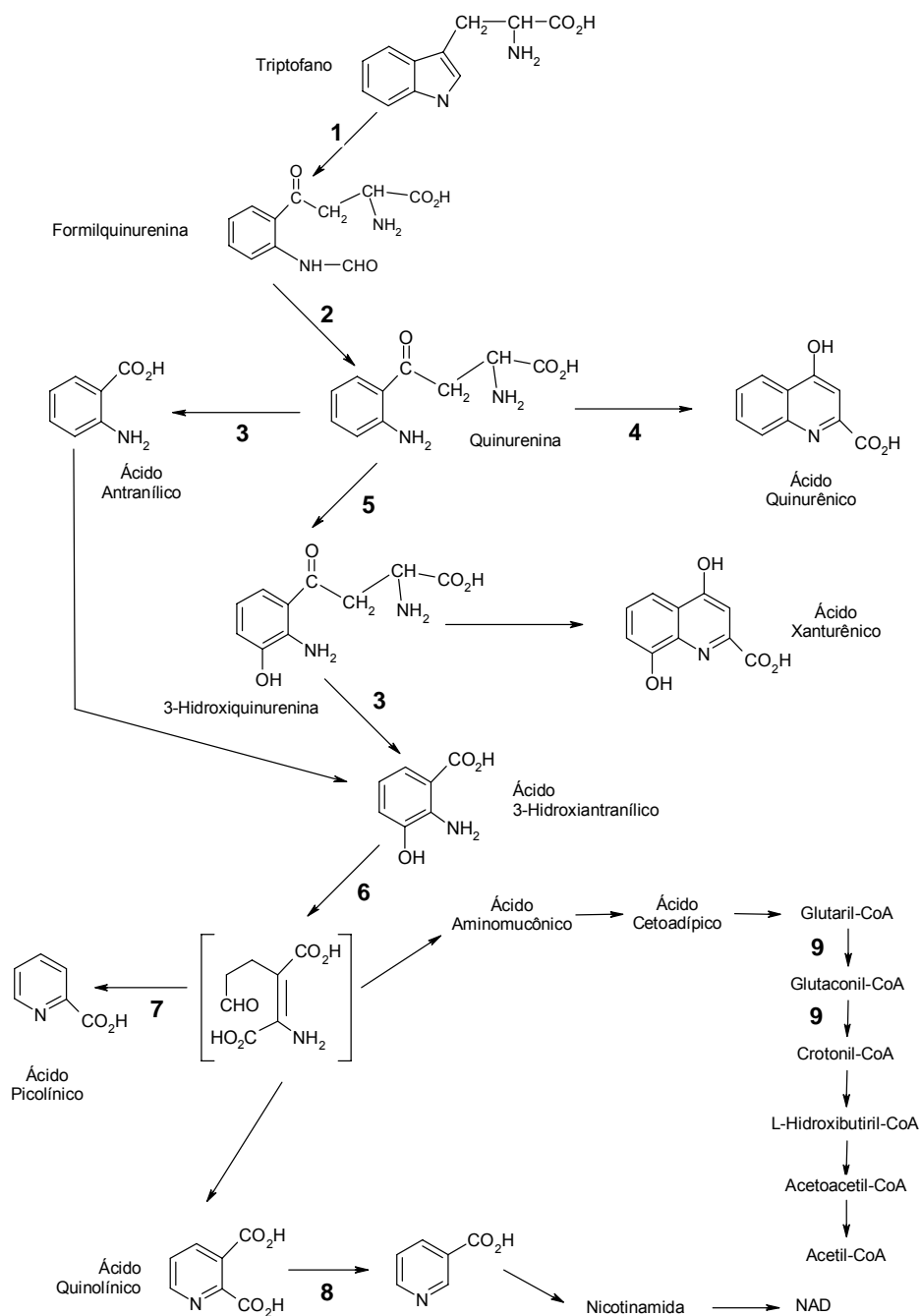


Figura I. 1 Rota de degradação do triptofano: via das quinureninas. (1) Triptofano ou Indoleamina 2,3-dioxigenase; (2) Quinurenina formidase; (3) Quinureninase; (4) Quinurenina aminotransferase; (5) Quinurenina 3-hidroxilaase; (6) Oxigenase do ácido 3-hidroxiantranílico; (7) Carboxilase picolínica; (8) AQFT; (9) Glutaril-CoA desidrogenase.

O QA tem sido utilizado como modelo animal de doença de Huntington, já que provoca lesão cerebral e alterações neurológicas semelhantes às da doença humana. O QA, ao ativar o complexo NMDA/canal iônico em concentrações neurotóxicas, aumenta o influxo intracelular de Ca^{2+} , causando o acúmulo citosólico desse íon. Este acúmulo intracelular de Ca^{2+} ativa a óxido nítrico sintase, ocorrendo a síntese de óxido nítrico (NO), um importante neurotransmissor, mas também um radical livre. O acúmulo de NO pode promover lipoperoxidação direta ou indiretamente ao reagir com o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) dando origem ao peroxinitrito (ONOO^{\bullet}) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Diversos estudos já comprovaram que o QA induz a peroxidação lipídica e estimula a produção de espécies reativas de oxigênio em cérebro de ratos (RIOS e SANTAMARIA, 1991; STÍPEK et al., 1997; BEHAN et al., 1999). Bordelon et al. (1997) também demonstraram que o QA altera parâmetros respiratórios em ratos após injeção intra-estriatal, mas ainda pouco se conhece sobre o efeito de tal substância no metabolismo energético cerebral.

A L-quinurenina (Kyn), por sua vez, parece estimular a expressão do fator de crescimento nervoso ("nerve growth factor", NGF) em células cultivadas da astrogliia de camundongos (DONG-RUYI et al., 1998). Por outro lado, injeções intracerebroventriculares de L-quinurenina induzem convulsões em camundongos, as quais podem ser revertidas por taurina (LAPIN, 1980).

Outro composto potencialmente neurotóxico da via das quinureninas é a 3-hidroxiquinurenina (3HKyn). Este composto parece ter seus efeitos neurotóxicos mediados pela geração de espécies reativas. O mecanismo de geração dessas espécies reativas parece ser através de reações de auto-oxidação, através das quais o metabolito é convertido a quinoneimina, tendo concomitante geração de espécies reativas, mais especificamente de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido (HIRAKU et al., 1995; DYKENS et al., 1987, 1989). Nesse contexto, já foi sugerido que a morte de culturas primárias de neurônios estriatais com padrão apoptótico causada pela 3HKyn é mediada por peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, já que a morte neuronal foi prevenida pela adição de catalase e

desferroxiamina, esta última impedindo a reação de Fenton (OKUDA et al., 1996, 1998).

Da mesma forma que a 3HKyn, o ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA) é um composto gerador de espécies reativas de oxigênio, visto que rapidamente sofre auto-oxidação com formação de ânions superóxido (DYKENS et al., 1987, 1989). Goldstein et al. (2000) demonstraram o papel da 3HKyn e do 3HAA na cataratogênese através da produção de espécies reativas de oxigênio. Também já foi comprovado o potencial carcinogênico desses dois compostos através da produção de peróxido de hidrogênio na presença dos íons Mn (II) e/ou Cu (II), os quais catalisam a reação de auto-oxidação. O peróxido formado reagiria com íons de metais de transição formando um complexo que subsequente produziria radicais hidroxila, que é capaz de provocar a quebra do DNA (HIRAKU et al., 1995).

Também já foi comprovado um comprometimento do metabolismo energético causado pelo acúmulo de 3HKyn e 3HAA. Baran et al. (2003) demonstraram que ambos os metabólitos alteram parâmetros respiratórios em mitocôndrias isoladas de músculo cardíaco de ratos, sugerindo que esse dano causado na respiração celular é devido, ao menos parcialmente, à produção de espécies reativas de oxigênio.

Por outro lado, outros investigadores mostraram evidências de que a 3HKyn e o 3HAA possuem atividade antioxidante e que o acúmulo desses metabólitos em determinadas condições patogênicas seria um mecanismo de defesa do organismo a fim de evitar o estresse oxidativo (CHRISTEN et al., 1990, 1992, 1994; GODA et al., 1999). O interferon γ é uma citocina central em processos antiinflamatórios que possui atividade antimicrobiana. Embora os mecanismos ainda não estejam claros, já se sabe que o interferon γ ativa a indoleamina 2, 3-dioxigenase e aumenta a produção de radicais livres em células fagocíticas. De acordo com Christen et al. (1990) esse processo estimula a rota das quinureninas com o objetivo de produzir a 3HKyn e o 3HAA, os quais apresentam propriedades antioxidantes. Essa propriedade antioxidante seria devido à estrutura orto-aminofenólica desses compostos, já que os análogos estruturais não fenólicos da

3HKyn e do 3HAA (a quinurenina e o ácido antranílico, respectivamente) não apresentaram essa atividade. De fato, ambos os compostos se mostraram melhores antioxidantes para radicais peroxila do que o Trolox e o ácido ascórbico (antioxidantes clássicos) em concentrações equimolares. Além disso, em situações de inflamação causada por infecções (pneumonia viral, por exemplo), além da produção de 3HKyn e do 3HAA que atuariam como antioxidantes, a ativação da enzima indoleamina 2, 3-dioxigenase se apresenta como outro mecanismo de proteção, já que remove o ânion superóxido em excesso para utilizá-lo como cofator. Portanto, a ativação enzimática e a síntese dos dois intermediários com propriedades antioxidantes parecem corresponder a uma adaptação fisiológica do organismo em resposta ao processo oxidativo.

I. 3 Doenças Neurodegenerativas e Quinureninas

Tem-se verificado nos últimos anos o acúmulo dos intermediários da via das quinureninas em algumas doenças neurodegenerativas, tais como nas doenças de Huntington, Alzheimer e Parkinson, bem como na demência associada à síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Também foi sugerido que o acúmulo de intermediários da rota das quinureninas estaria envolvido no processo patogênico presente na acidemia glutárica tipo I, um erro inato do metabolismo (HEYES, 1987; VARADKAR E SURTEES, 2004).

Vários estudos indicaram similaridades marcantes entre os efeitos do ácido quinolínico (QA) e os sintomas apresentados pelos pacientes portadores da doença de Huntington, o que aventou a hipótese de que o metabólito estaria envolvido intimamente na fisiopatologia dessa doença. Infusão crônica de QA diretamente em estriado de ratos é capaz de produzir alterações histológicas e déficit motor e comportamental semelhantes aos observados na doença de Huntington (SUSEL et al., 1991; SHEAR et al., 1998). Além disso, lesões estriatais ocasionadas por QA em macacos produzem distonia e discinesia muito semelhantes às encontradas nessa doença (STOREY et al., 1994; BURNS et al., 1995). Também se evidenciou que as alterações nos níveis de glutamato e

outros aminoácidos produzidas pelo QA eram similares às encontradas em pacientes afetados por essa doença (ELLISON et al., 1987; STOREY et al., 1992; NICHOLSON et al., 1995). Outras lesões neurológicas encontradas nos pacientes afetados pela doença de Huntington foram mimetizadas com injeções intraestriatais de QA em ratos, tais como depleção de GABA e substância P de células estriatais sem mudanças nos níveis de dopamina (BEAL et al., 1986, 1989 a, b, 1991 a, b). Um modelo de dano neuronal seletivo similar ao presente nos pacientes foi demonstrado em culturas estriatais organotípicas incubadas com QA (KOH et al., 1986; KOH e CHOI, 1988). Apesar das evidências que indicam similaridades entre a fisiopatologia da doença de Huntington e os efeitos causados pelo QA, não foram detectados níveis alterados de QA no líquido cefalorraquidiano dos pacientes quando comparados com controles (REYNOLDS et al., 1988; SCHWARCZ et al., 1988 a, HEYES et al., 1992).

A 3-hidroxiquinurenina (3HKyn), outro intermediário da via das quinureninas, também pode estar envolvida na patogênese da doença de Huntington. Níveis elevados desse metabólito (0,8 μM) foram detectados no córtex temporal, córtex frontal e putâmen de pacientes portadores da doença (REYNOLDS e PEARSON, 1989; PEARSON e REYNOLDS, 1992) e o achado é consistente com o fato do aumento da atividade da enzima 3-hidroxi-antranilato oxigenase, demonstrado por Schwarcz et al. (1988b).

Os níveis de 3HKyn também se encontram aumentados no córtex frontal, putâmen e substância nigra de cérebro de pacientes portadores da doença de Parkinson (OGAWA et al., 1992). A razão entre 3HKyn e quinurenina também está diminuída na substância nigra em relação aos níveis dos controles, com mudanças similares no córtex frontal e putâmen. Portanto, presume-se que o acúmulo da 3HKyn pode contribuir, ao menos em parte, para a degeneração dos neurônios dopaminérgicos dessas regiões cerebrais nessa doença.

Recentemente foi demonstrado o envolvimento das quinureninas na doença de Alzheimer. Foi verificado que as concentrações séricas elevadas de quinureninas nos pacientes são proporcionais ao déficit cognitivo (BARAN et al., 1999; WIDNER et al., 1999, 2000). Foi ainda observado que o peptídeo β -

amilóide, cujo acúmulo na forma de placas (conhecidas como placas senis) está associado à doença de Alzheimer, induz a produção de QA por macrófagos e, principalmente, pela microglia (GUILLEMIN et al., 2002). Contudo, não foi verificado acúmulo de QA no cérebro de pacientes portadores da doença de Alzheimer. Isto pode ser explicado pelo fato de que o QA estaria associado a essas placas senis (COOPER et al., 2000). Também é importante ressaltar que já foi comprovada a indução de produção do QA pelo A β 1-42 por microglia e macrófagos, o qual é um produto da clivagem do peptídeo amilóide β . Outra ação neurotóxica marcante do QA, a peroxidação lipídica, também já foi detectada na doença de Alzheimer.

Cerca de 20 % dos pacientes portadores de SIDA apresentam envolvimento do sistema nervoso central na doença, com déficit cognitivo, disfunção motora e alterações comportamentais. Nos pacientes que apresentam demência associada à SIDA, já foi relatado que os níveis de QA no líquido cefalorraquidiano estão aumentados em torno de vinte vezes, o que pode estar relacionado com a disfunção motora e cognitiva encontrada nos pacientes afetados (HEYES et al., 1989, 1991; MARTIN et al., 1992). Já no cérebro desses pacientes os níveis de QA chegam a ser trezentas vezes maiores do que os níveis medidos no líquido cefalorraquidiano (HEYES et al., 1998). Achim et al. (1996) demonstraram níveis cerebrais post-mortem de QA em torno de 2,3 pmols / mg de tecido em pacientes, enquanto que nos controles os níveis foram menores que 0,1 pmol / mg de tecido (ACHIM et al, 1996). O tratamento da SIDA com zidovudina leva a diminuição da concentração de QA concomitante a uma melhora do quadro neurológico (STONE et al, 2001). O acúmulo de QA nos pacientes afetados pela SIDA ocorre provavelmente devido à ativação de células pelo sistema imune como parte da reação inflamatória gerada pela infecção. Também se sabe que enzimas da rota das quinureninas, inclusive a limitante indoleamina 2, 3-dioxigenase, são ativadas em situações de inflamação e por interferon γ produzido em infecções virais, o que leva não só ao acúmulo de QA, como de outros intermediários dessa rota (HEYES et al, 1992; PEMBERTON et al, 1997).

I. 4 Radicais Livres

Definição

Um radical livre é qualquer espécie química capaz de existir de forma independente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados (SOUTHORN e POWIS, 1988; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). O desemparelhamento de elétrons, situação energeticamente instável, é o que confere alta reatividade a essas espécies. Os radicais livres podem ser formados pela perda de um elétron de um não-radical ou pelo ganho de um elétron por um não-radical. Radicais podem também ser formados em um processo de fissão homolítica, no qual uma ligação covalente é quebrada e cada elétron do par compartilhado permanece com cada um dos átomos envolvidos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Quando um radical livre reage com um composto não-radical, outro radical livre pode ser formado; assim, a presença de um único radical pode iniciar uma seqüência de reações em cadeia de transferência de elétrons (redox) (MAXWELL, 1995). Nas reações em cadeia induzidas pelos radicais livres, um radical reativo leva à formação de um produto que também é um radical livre e que, por sua vez, reage produzindo um terceiro radical.

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o oxigênio molecular (O_2) sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (H_2O). No entanto, aproximadamente 5% do oxigênio utilizado na cadeia respiratória mitocondrial não é completamente reduzido à água, podendo ser convertido a intermediários reativos como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxila (OH^{\bullet}), e também o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), processo esse que pode ser exacerbado em condições patológicas (BOVERIS e CHANCE, 1973).

O termo genérico espécies reativas de oxigênio (ERO) é usado para incluir não só os radicais formados pela redução do O_2 ($O_2^{\bullet-}$ e OH^{\bullet}), mas também alguns não-radicais derivados do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio *singlet* (1O_2) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Além dessas, existem

ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo o óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o peroxinitrito (ONOO^-) as principais representantes.

As ERO e ERN ocorrem tanto em processos fisiológicos quanto patológicos do organismo. Fisiologicamente essas espécies reativas apresentam diversas funções (BERGENDI et al., 1999). Assim, um aumento da liberação local de radicais livres pode ser benéfico, como é o caso da liberação de espécies tóxicas oxidantes pelos neutrófilos, que podem atuar na defesa do hospedeiro contra uma infecção (DELANTY e DICHTER, 1998). Participam ainda de processos de sinalização celular e também estão envolvidos na síntese e regulação de algumas proteínas (WARD e PETERS, 1995).

Por outro lado, quando formadas em excesso, essas espécies altamente reativas tem o potencial de oxidar moléculas biológicas incluindo proteínas, lipídios e DNA (MAXWELL, 1995). Com relação aos efeitos prejudiciais das reações oxidantes ao organismo, os radicais livres podem promover lipoperoxidação; podem causar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL); podem reagir com proteínas, levando à sua inativação e conseqüente alteração de sua função; e podem também reagir com o DNA e RNA, levando a mutações somáticas e a distúrbios de transcrição (DELANTY e DICHTER, 1998), entre outros efeitos.

I. 5 Lipoperoxidação

Antes de ser vista como um mecanismo de dano oxidativo, a lipoperoxidação deve ser considerada como um processo fisiológico contínuo que ocorre normalmente nas membranas celulares. Além de ser um fator de renovação da membrana, este processo é essencial na síntese de prostaglandinas e leucotrienos, bem como na fagocitose e pinocitose. No entanto, por serem formadas em grande parte por lipídios insaturados e proteínas, as membranas são particularmente vulneráveis ao ataque oxidativo. Assim, quando a produção de espécies reativas aumentar além da capacidade de detoxificação, esse processo será exacerbado, e com isso, a lipoperoxidação poderá acarretar profundas alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Isso irá

causar perda de seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos como o malondialdeído e o 4-hidroxinonenal, entre outros eventos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A lipoperoxidação é representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. A iniciação é causada pelo ataque a um lipídio de membrana por parte de qualquer espécie que tenha reatividade suficiente para abstrair um átomo de hidrogênio de um grupo metileno (-CH₂-). Nesse contexto, radicais hidroxila podem prontamente iniciar a lipoperoxidação. Já que o átomo de hidrogênio tem apenas um elétron, a abstração de H• de um grupo metileno deixa um elétron desemparelhado no carbono (-•CH-). Esse radical formado é geralmente estabilizado por um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado. O destino mais provável desse radical é reagir com o O₂, formando um radical peroxila (ROO•). Os radicais peroxila, por sua vez, são capazes de abstrair um próton de outra molécula lipídica, sendo esta fase conhecida como a fase de propagação. O radical de carbono formado pode reagir com o O₂ para formar outro radical peroxila, e assim sucessivamente. A abstração de um hidrogênio de outro lipídio por parte do radical peroxila gerará um hidroperóxido lipídico (LOOH). O término da reação poderá ocorrer quando dois radicais produzidos nas etapas anteriores reagirem entre si, formando um produto estável (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

I. 6 Defesas Antioxidantes

Para evitar os efeitos danosos das espécies reativas, existem mecanismos eficientes para a detoxificação das mesmas, como a produção endógena de enzimas antioxidantes e alguns antioxidantes não-enzimáticos. Embora diferindo na composição, as defesas antioxidantes estão amplamente distribuídas no organismo e compreendem:

- * agentes que removem cataliticamente os radicais livres, como as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, entre outras;

- * proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes (íons de ferro e cobre, por exemplo), ao se ligarem aos mesmos como as transferrinas;

* proteínas que protegem biomoléculas de danos (incluindo dano oxidativo) por outros mecanismos;

* agentes de baixo peso molecular que aprisionam espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como glutathione, α -tocoferol, ácido ascórbico e a bilirrubina.

I. 7 Estresse Oxidativo

Em condições normais (organismos saudáveis), a produção de espécies reativas é em sua maior parte balanceada pelos sistemas de defesa antioxidante do organismo. No entanto, em determinadas condições patológicas pode haver um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e as defesas antioxidantes, favorecendo a ocorrência de estresse oxidativo.

Assim, o termo “Estresse Oxidativo” é usado para se referir à situação na qual a geração de espécies reativas ultrapassa a capacidade das defesas antioxidantes disponíveis. Pode resultar tanto de uma diminuição das defesas antioxidantes quanto de uma produção aumentada de oxidantes, bem como da liberação de metais de transição ou a combinação de quaisquer desses fatores (HALLIWELL, 2001).

O estresse oxidativo pode promover adaptação, dano ou morte celular:

* *Adaptação*: as células podem geralmente tolerar um estresse oxidativo moderado, que geralmente resulta em *up-regulation* da síntese de sistemas de defesa antioxidante a fim de restaurar o balanço oxidante/antioxidante. Apesar disso, nem sempre o estresse oxidativo precisa envolver defesas antioxidantes aumentadas.

* *Dano celular*: o estresse oxidativo pode danificar todos os alvos moleculares (DNA, proteínas, carboidratos e lipídios) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). A resposta à injúria pode ser reversível: a célula entra em *steady state* alterado temporário ou prolongado que não leva à morte celular.

* *Morte celular*: pode ocorrer tanto por necrose quanto por apoptose. Na morte celular por necrose, a célula incha e se rompe, liberando seu conteúdo para o meio extracelular. Pode haver a liberação de antioxidantes, como a

catalase e a glutathione, e também de pró-oxidantes, como os íons cobre e ferro e proteínas do grupo HEME, agentes esses que podem afetar as células adjacentes, podendo até mesmo impor a elas um estresse oxidativo. Já na apoptose o mecanismo intrínseco de suicídio celular é ativado, e não há a liberação do conteúdo celular. A morte celular por apoptose pode ser acelerada em certas doenças, como as desordens neurodegenerativas, havendo envolvimento do estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Além da indução de necrose e apoptose, o estresse oxidativo pode levar a um aumento da lipoperoxidação, cujos produtos (malondialdeído e 4-hidroxinonenal, entre outros) são altamente neurotóxicos, e a um dano oxidativo tanto às proteínas, inibindo a atividade de diversas enzimas e alterando a função celular, quanto ao DNA, causando alteração de bases púricas e pirimídicas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

I. 8 Estresse Oxidativo e Doenças Neurodegenerativas

Numerosas hipóteses têm sido propostas para explicar a fisiopatologia das doenças de Alzheimer, Huntington e Parkinson, sem, entretanto, obter até o momento uma explicação satisfatória para o dano cerebral dessas doenças. No entanto, acredita-se que possíveis mecanismos envolvam deficiência no metabolismo energético, estresse oxidativo e neurotoxicidade mediada por receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, ou, possivelmente, um somatório desses fatores (ROSE e HENNEBERRY, 1994).

O cérebro é altamente dependente de energia para o seu funcionamento normal e a mitocôndria é a estrutura intracelular responsável pela produção dessa energia. Para a produção eficiente de energia na forma de ATP, a mitocôndria possui uma alta demanda por oxigênio, já que utiliza uma grande quantidade de O₂ em uma massa de tecido relativamente pequena, o que torna esse tecido altamente susceptível à ação de espécies reativas. Outros fatores também contribuem para essa susceptibilidade como o alto conteúdo de ferro presente no cérebro, que pode favorecer a lipoperoxidação; o seu alto conteúdo lipídico em

relação aos outros tecidos, principalmente lipídios de cadeia lateral poliinsaturada, que são extremamente susceptíveis à lipoperoxidação; e à sua modesta defesa antioxidante, sendo os níveis de catalase particularmente baixos em muitas regiões cerebrais (HALLIWELL, 1996; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Além disso, uma disfunção mitocondrial pode ocorrer por diminuição da atividade dos complexos da cadeia respiratória com um conseqüente prejuízo no transporte de elétrons, o que leva a uma dispersão dos elétrons na forma de radicais livres potencialmente danosos à célula.

Numerosas evidências sugerem que os radicais livres e o estresse oxidativo possam estar envolvidos na patogênese dos danos neurológicos de várias doenças neurodegenerativas. Estudos demonstraram uma diminuição na atividade do complexo I da cadeia respiratória em cérebros *postmortem* de pacientes portadores de doença de Parkinson. Essa inibição do complexo I pode acarretar na geração de espécies reativas, tais como ânion superóxido, radicais hidroxila e peroxinitrito, as quais poderiam causar um prejuízo ainda maior na cadeia transportadora de elétrons. Dessa forma, é possível que o estresse oxidativo e as disfunções mitocondriais formem um ciclo vicioso na doença de Parkinson (GU et al., 1996; JANETSKY et al., 1994; SCHAPIRA et al., 1989, 1990 a, b).

Na doença de Alzheimer, a mais comum dentre as doenças neurodegenerativas, é possível que o estresse oxidativo tenha um papel chave na morte neuronal. Têm sido proposto que o peptídeo β -amilóide, o formador das chamadas placas senis, tenha a capacidade de gerar radicais livres espontaneamente. Estudos *in vivo* também evidenciaram um dano oxidativo em cérebros humanos *post-mortem* com doença de Alzheimer através da observação de aumento de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdGA), produtos de oxidação de outras bases e de RNA, carbonilas de proteínas, nitrotirosina e marcadores de peroxidação lipídica (SMITH et al., 1991; MARKESBERY et al., 1999; NOUROOZ-ZADEH et al., 1999; LOVELL et al., 2000).

Por outro lado, vários estudos têm evidenciado um dano oxidativo importante em pacientes portadores da doença de Huntington, particularmente representado pela formação de 3-nitrotirosina nas áreas afetadas (MARK et al.,

1999; ALEXI et al., 2000). Entretanto, o dano oxidativo observado nessa doença aparentemente tem menor importância que nas doenças de Parkinson e Alzheimer.

Considerando a importância dos radicais livres e do estresse oxidativo como importante mecanismo fisiopatológico de doenças neurodegenerativas, têm surgido diversas drogas para a terapia de pacientes portadores dessas doenças baseadas em um mecanismo antioxidante, tais como sequestradores de ânion superóxido, análogos da vitamina E, inibidores da peroxidação lipídica, inibidores da enzima óxido nítrico sintase, entre outras.

II OBJETIVO

II. 1 Geral

O objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito *in vitro* de várias quinureninas (quinurenina, 3-hidroxiquinurenina, ácido antranílico, ácido 3-hidroxi-antranílico e ácido quinolínico) sobre vários parâmetros de estresse oxidativo em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens, bem como em células C6 de glioma de ratos.

II. 2 Específicos

- Avaliar o efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina, quinurenina, ácido 3-hidroxi-antranílico, ácido antranílico e ácido quinolínico sobre os parâmetros de peroxidação lipídica (níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico: TBA-RS e quimiluminescência) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens;
- Avaliar o efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina, quinurenina, ácido 3-hidroxi-antranílico, ácido antranílico, e ácido quinolínico sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens;
- Avaliar o efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina e da quinurenina sobre a oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) (produção

de espécies reativas) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens;

- Avaliar o efeito da 3-hidroxiquinurenina, quinurenina, ácido 3-hidroxiantranílico e ácido antranílico sobre a oxidação da 2-deoxi-D-ribose;
- Avaliar o efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina, quinurenina, ácido 3-hidroxiantranílico e ácido antranílico sobre a redução de radicais peroxila derivados do 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP);
- Avaliar o efeito *in vitro* do ácido quinolínico sobre o potencial antioxidante total (TRAP) e a reatividade antioxidante total (TAR) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens;
- Avaliar o efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) e sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de ácido glutárico em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens;
- Avaliar o efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de ácido glutárico (GA) e ácido 3-hidroxi glutárico (HGA), e ainda de QA na presença ou ausência de GA e HGA em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens;
- Avaliar o efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), a reatividade antioxidante total (TAR) e a morfologia em células C6 de glioma de ratos.

III MATERIAL E MÉTODOS

III. 1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram de grau de pureza pró-análise (PA).

Os metabólitos 3-hidroxiquinurenina (3HKyn), quinurenina (Kyn), ácido 3-hidroxi-antranílico (3HAA), ácido antranílico (AA) e ácido quinolínico (QA) foram sempre dissolvidos e diluídos em tampão contendo fosfato de sódio 20 mM e cloreto de potássio 140 mM, pH 7,4, no dia da realização dos ensaios.

III. 2 Reagentes utilizados

- 2-Deoxi-D-Ribose – Sigma
- 2, 2'-Azo-Bis-(2-Amidinopropano) (ABAP) – Wako
- 2, 7-Diclorofluoresceína – Sigma
- 3-Hidroxiquinurenina – Sigma
- Ácido 6-Hidroxi-2, 5, 7, 8-Tetrametil-Cromano-2-Carboxílico (Trolox) – Sigma
- Ácido 3-Hidroxi-Antranílico – Sigma
- Ácido Antranílico – Sigma
- Ácido Ascórbico – Sigma
- Ácido Metafosfórico – Aldrich
- Ácido Quinolínico – Sigma
- Ácido Tiobarbitúrico – Merck
- Ácido Tricloroacético – Synth
- Albumina – Sigma
- Carbonato de Sódio – Isofar
- Cloreto Férrico – Synth
- Cloreto de Potássio – Nuclear
- Diacetato de 2, 7-Diclorofluoresceína – Sigma
- Etilenodiaminotetracético (EDTA) – Sigma

- Fosfato de Sódio Dibásico – Vetec
- Fosfato de Sódio Monobásico – Vetec
- Hidróxido de Sódio – Synth
- Glicina – Sigma
- Glutamina – Sigma
- L-Quinurenina – Sigma
- Luminol – Sigma
- *Orto*-Ftaldialdeído – Sigma
- Sulfato Cuproso – Merck
- Tartarato de Potássio – Merck

III. 3 Equipamentos e outros materiais

- Agitador de tubos Thermolyne modelo Maxi Mix Plus
- Agitador magnético Fisaton modelo 1005
- Balança Acculab modelo V-200
- Balança analítica digital Sartorius Basic
- Balança digital Kern modelo 430-21
- Banho-maria Biomatic modelo 1052
- Centrífuga Eppendorf modelo 5403
- Centrífuga Eppendorf modelo 5417R
- Contador de cintilação líquida Wallac modelo 1409
- Contador de cintilação líquida Tri-carb modelo 2100TR
- Deionizador
- Destilador
- Espectrofotômetro Hitachi modelo U-2001 com controle de temperatura
- Espectrofotômetro de fluorescência Hitachi modelo F-2000
- Espectrofotômetro Spectronic modelo Genesys 8
- Freezer -20°C Prosdócimo modelo H5
- Guilhotina
- Homogeneizador elétrico B. Braun Biotech International modelo Potter S

- Máquina de gelo Everest
- Material cirúrgico: tesouras, bisturis e espátulas
- Micropipetas de volume regulável Gilson
- Potenciômetro modelo Tec-2 (Tecnal).
- Refrigerador Brastemp
- Tubos plásticos Eppendorf
- Vidraria: provetas, pipetas graduadas, potter de vidro, balões volumétricos, pacas de Petri, pipetas Pasteur, tubos de ensaio, béqueres, cubetas, vials, poços de vidro, frascos

III. 4 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos do Biotério do Departamento de Bioquímica do ICBS, UFRGS. Os animais tiveram livre acesso à água e à ração comercial (Germani, POA, RS, Brasil) contendo 20,5% proteína (predominantemente de soja), 54% de carboidratos, 4% de lipídios, 4,5% de fibras, 7% cinzas e 10% de umidade. Eles foram mantidos em ciclo claro-escuro de ± 12 horas a uma temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$.

III. 5 Preparação da amostra e incubação

Ratos machos Wistar de 30 dias de idade foram utilizados para todas as técnicas. Os ratos foram sacrificados por decapitação, o cérebro foi removido e o córtex dissecado. A seguir, o córtex cerebral foi homogeneizado em tampão contendo fosfato de sódio 20 mM e cloreto de potássio 140 mM, pH 7,4, na proporção de 1:10 (P/V) e o homogeneizado obtido foi levado à centrifugação a 650 g durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante obtido foi separado. Finalmente, alíquotas foram retiradas para a realização de uma pré-incubação de 1 hora na ausência dos metabólitos (grupo controle) ou presença dos mesmos (grupos teste).

III. 6 Manutenção da linhagem celular

A linhagem de células C6 de glioma de ratos é originalmente derivada de um tumor cerebral de ratos induzido com N-nitrosometiluréia (BENDA et al., 1968). As células C6 possuem propriedades oligodendrocitárias, astrocitárias e neuronais (PARKER et al., 1980), constituindo um modelo útil para estudos de diferenciação celular glial (MANGOURA et al., 1989) e de migração celular de glioma (GOLDBERG et al., 1992).

A linhagem celular foi obtida da American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA). As células foram crescidas em meio DMEM (pH 7,4) contendo 2,5mg / mL de fungizona e 100 U / L de gentamicina suplementado com 5 % de FBS. As células foram mantidas a temperatura de 37 °C, umidade relativa mínima de 95 % e atmosfera contendo 5 % de CO₂.

III. 7 Estudos Morfológicos

Após as células terem atingido confluência, o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas por 1, 6, 12, 24 ou 48 horas a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂ / 95% de ar em DMEM (pH 7,4) contendo 0 % de FBS na ausência (controle) ou presença de 100 µM de 3HKyn. Os estudos morfológicos foram realizados usando contraste de fase óptica.

III. 8 Preparação dos homogeneizados de células

Após a incubação (1-48 horas) na presença de 100 µM de 3HKyn, o meio foi descartado e as células lavadas e homogeneizadas em tampão fosfato de sódio 20 mM contendo 140 mM de KCl, pH 7,4. Os homogeneizados de células C6 foram imediatamente utilizados para as medidas.

III. 9 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

A medida de níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) foi realizada de acordo com o método de Esterbauer e Cheeseman (1990). 300 µL de ácido tricloroacético 10 % foram adicionados à alíquota retirada da incubação previamente realizada. Após centrifugação, 300 µL do sobrenadante foram tratados com ácido tiobarbitúrico 0,67 % na proporção de 1:1. A mistura foi

levada a um banho fervente durante 25 min e, após, resfriada em água a temperatura ambiente. A absorvância obtida através da coloração rósea resultante foi medida em espectrofotômetro a 532 nm. Concomitantemente, foi feita uma curva de calibração com 1, 1, 3, 3 – tetrametoxipropano, na qual todos os pontos foram tratados da mesma forma que as amostras. Os resultados foram expressos como nmol TBA-RS / mg de proteína.

III. 10 Quimiluminescência

A medida da quimiluminescência foi realizada através do método de González-Flecha et al. (1991). Aos tubos foram adicionados 3,5 mL de tampão contendo fosfato de sódio 20 mM e cloreto de potássio 140 mM, pH 7,4, e a luminescência basal foi medida em contador de cintilação líquida durante 5 min. Após essa leitura, uma alíquota de 500 μ L das amostras incubadas foi imediatamente adicionada e a quimiluminescência foi medida durante 30 min a temperatura ambiente. Todo o procedimento foi realizado em sala escura e à temperatura ambiente. Os tubos utilizados para esta técnica foram lavados separadamente de outros materiais do laboratório com solução detergente, exaustivamente enxaguados com água destilada, fervidos por 10 minutos e mantidos no escuro 12 horas antes do experimento. O valor total foi diminuído do valor basal e os resultados foram expressos como cpm / mg proteína.

III. 11 Medida das concentrações de glutathiona reduzida (GSH)

As concentrações de glutathiona reduzida (GSH) foram medidas de acordo com a técnica de Browne e Armstrong (1998). As alíquotas provenientes da pré-incubação foram tratadas com ácido metafosfórico com o objetivo de precipitar as proteínas e proporcionar um meio com pH ácido para a glutathiona ser mantida na forma reduzida. Após centrifugação, foram adicionados 50 μ L de o-ftaldialdeído a 100 μ L do sobrenadante obtido. A fluorescência gerada foi medida com comprimentos de onda de excitação e emissão de 350 e 420 nm, respectivamente. A curva de calibração foi realizada com GSH padrão (0,01-1 mM) e a concentração expressa em pmol GSH / mg proteína.

III. 12 Oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA)

A produção de espécies reativas foi determinada de acordo com o método de LeBel et al. (1992) utilizando o diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA). Às alíquotas provenientes da pré-incubação, adicionou-se a forma diacetato do DCF, a qual é permeável a membrana celular, e essas alíquotas foram então incubadas durante 30 min a 37 °C. No meio intracelular, esterases clivam o grupamento acetato do DCFH-DA, gerando a forma reduzida DCFH. As espécies reativas presentes no meio oxidam o DCFH, produzindo o produto fluorescente DCF. A fluorescência foi medida usando comprimentos de onda de 480 e 535 nm, respectivamente. A curva de calibração foi realizada com DCF padrão (0-10 µM) e a concentração das espécies reativas foi expressa em pmol de DCF formado / mg proteína.

III. 13 Medida da oxidação da 2-deoxi-D-ribose

A atividade sequestradora dos compostos estudados para o radical hidroxila foi determinada através da formação do cromógeno malondialdeído a partir da oxidação da 2-deoxi-D-ribose pelos radicais hidroxila (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1981). O meio de reação para a geração de radicais hidroxila consistiu de FeCl₃ 20 µM, EDTA 100 µM, H₂O₂ 500 µM e ácido ascórbico 100 µM em tampão fosfato de sódio 20 mM contendo cloreto de potássio, pH 7,4. Foram adicionados então os metabólitos a serem testados (0,1-100 µM), 3 mM de 2-deoxi-D-ribose e, após uma hora de incubação, a reação foi terminada com adição de ácido tricloroacético 10 % e ácido tiobarbitúrico 0,67 %. Os tubos foram então levados em banho fervente durante 25 min e após isso, resfriados por 5 min. A coloração rósea resultante foi lida em espectrofotômetro a 532 nm. Os resultados foram expressos em absorvância.

III. 14 Medida da redução de radicais derivados do 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP)

A capacidade de redução de radicais derivados do 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP) foi determinada a partir da quimiluminescência gerada a partir da oxidação do luminol pelos radicais peroxila gerados por decomposição térmica do ABAP de acordo com o método de Lissi et al. (1992). A quimiluminescência basal foi medida com a adição de 4,0 mL de ABAP dissolvido em tampão glicina 0,1 M, pH 8,6, em tubos de vidro de cintilação. A seguir, foram adicionados 10 µL de luminol em cada vial e a quimiluminescência foi medida. Este foi considerado o valor basal. 10 µL de Trolox (150, 300 ou 600 µM) ou os metabólitos 3-hidroxiquinurenina (3HKyn), quinurenina (Kyn), ácido 3-hidroxi-antranílico (3HAA) e ácido antranílico (AA), na concentração de 100 µM, foram adicionados, e a quimiluminescência foi medida até atingir valores próximos aos da quimiluminescência basal. Este tempo necessário para atingir valores próximos ao valor basal foi chamado de tempo de indução, o qual é diretamente proporcional à atividade antioxidante dos compostos. Os tempos de indução obtidos para os metabólitos do triptofano foram comparados com o tempo de indução do Trolox.

III. 15 Potencial Antioxidante Total (TRAP)

A medida da capacidade antioxidante total (TRAP) do tecido foi realizada segundo o método de Lissi et al. (1992). Esta determinação é dada pela medida da intensidade de quimiluminescência do luminol induzida pelos radicais peroxila gerados através da decomposição térmica do 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP) à temperatura ambiente. Para a preparação das soluções de uso (ABAP 10 mM, luminol 4 mM e Trolox 80 µM) foi utilizado tampão glicina 0,1 M, pH 8,6. A solução de ABAP foi utilizada como formadora de radicais livres, a de luminol como amplificadora do sinal de quimiluminescência e a de Trolox (vitamina E hidrossolúvel) como padrão antioxidante. Os tubos utilizados para o ensaio permaneciam vazios no escuro por pelo menos 30 minutos. Para a contagem

basal (120 segundos), foram adicionados 4 mL de solução de ABAP 10 mM ao vial. A seguir, 10 μ L da solução de luminol foram acrescentados e lidos por mais 120 segundos. Essa medida foi considerada o valor inicial. Foram colocados, então, 10 μ L da solução de Trolox 80 μ M, o qual diminuiu essa luminescência por determinado tempo até os valores iniciais. Para a medida das amostras, adicionou-se 10 μ L de homogeneizado previamente incubado com o referido ácido nas concentrações testadas. O tempo necessário para que a luminescência retornasse ao valor inicial foi considerado o tempo de indução. O tempo indução é diretamente proporcional à capacidade antioxidante do tecido comparado com o tempo de indução do Trolox. Os resultados foram expressos em nmol de Trolox / mg de proteína.

III. 16 Reatividade Antioxidante Total (TAR)

A medida da reatividade antioxidante total (TAR) representa a qualidade dos antioxidantes de um determinado tecido ou órgão. A TAR é determinada através da medida da intensidade de quimiluminescência do luminol induzida pelo 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP) à temperatura ambiente (Lissi et al, 1995). Para a preparação das soluções de uso (ABAP 10 mM, luminol 4 mM e Trolox 80 μ M) foi utilizado tampão glicina 0,1 M, pH 8,6. A solução de ABAP foi utilizada como formadora de radicais livres, a de luminol como amplificadora do sinal de quimiluminescência e a de Trolox (vitamina E hidrossolúvel) como padrão antioxidante. Inicialmente, a quimiluminescência basal é medida em cintilador através da adição de 4 mL de ABAP 2,0 mM em um tubo no escuro. 15 μ L de luminol foram então adicionados ao vial e a quimiluminescência foi medida. Este foi considerado o valor inicial. 10 μ L de Trolox 10-100 μ M (curva de calibração) ou amostra foram então adicionados e a quimiluminescência foi medida durante 60 seg. O Trolox ou a amostra reduz a quimiluminescência inicial e essa rápida redução na intensidade gerada pelo luminol é considerada uma medida da TAR. A medida da TAR foi expressa como nmol de Trolox / mg de proteína.

III. 17 Medida de proteínas

O conteúdo protéico em todas as técnicas empregadas foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951), usando albumina bovina sérica como padrão.

III. 18 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e a média usada para os cálculos. A significância estatística foi determinada pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Duncan, quando o F foi significativo. O teste de regressão linear foi também utilizado para se verificar efeitos de dose-resposta. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Toda a análise estatística foi feita através do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) em um computador PC compatível.

IV RESULTADOS

Inicialmente estudamos o efeito da 3-hidroxiquinurenina, quinurenina, ácido 3-hidroxi-antranílico, ácido antranílico e ácido quinolínico, metabólitos da via das quinureninas, sobre os parâmetros de lipoperoxidação em córtex cerebral de ratos jovens: medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e quimiluminescência.

IV. 1 – Efeito *in vitro* dos metabólitos da via das quinureninas sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens

IV. 1. 1 – Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens

A figura IV. 1 mostra que a 3HKyn, na concentração de 100 μ M, diminuiu significativamente a medida das TBA-RS [$F(3,20)=3,957$; $p<0,05$]. Visto que dados da literatura evidenciaram a geração de espécies reativas pela 3HKyn, foram realizados experimentos onde foi adicionado íon ferroso (Fe II) para facilitar a reação de Fenton caso houvesse geração de peróxido de hidrogênio pelo metabólito (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999). Na figura IV. 2, verifica-se que a 3HKyn diminuiu as TBA-RS mesmo na presença de Fe II [$F(4,25)=13,783$; $p<0,001$]. Também foi verificado o efeito da 3HKyn sobre as TBA-RS na presença do íon férrico (Fe III). A adição de íon Fe III teve por objetivo catalisar a reação de auto-oxidação do composto, a qual ocorre com concomitante geração de espécies reativas (HIRAKU et al, 1995; DYKENS et al, 1987). A figura IV. 3 mostra que a 3HKyn, na concentração de 100 μ M, diminuiu significativamente a medida do TBA-RS na presença do íon Fe III [$F(4,25)=41,550$; $p<0,001$]. Além disso, pode-se observar que, nas figuras IV. 2 e IV. 3, a adição dos íons Fe II ou Fe III aumentou significativamente os valores de TBA-RS em córtex cerebral de ratos jovens.

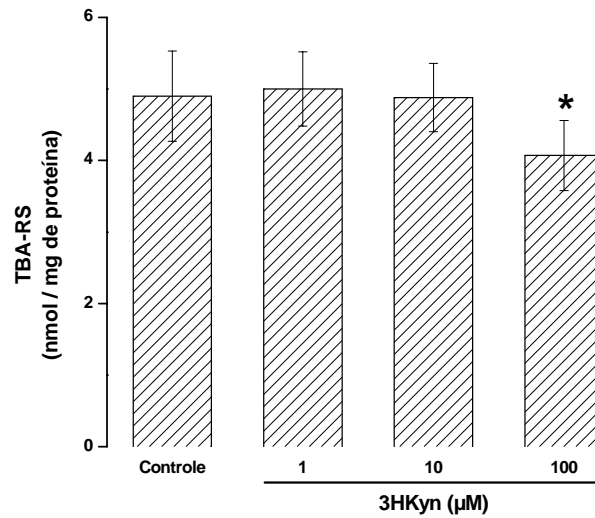


Figura IV. 1 – Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenia (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (*p<0,05, comparado ao controle).

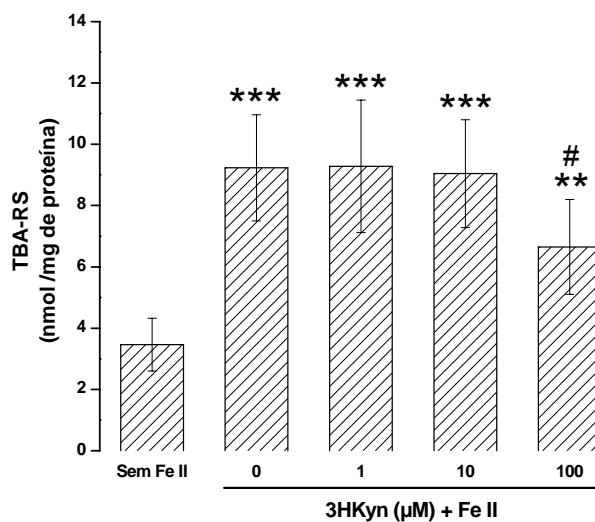


Figura IV. 2 – Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de 25 μM de íon ferroso (Fe II) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média ± desvio padrão (n=6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (**p<0,01, ***p<0,001, comparado ao Sem Fe II; #p<0,05, comparado ao 3HKyn 0 + Fe II).

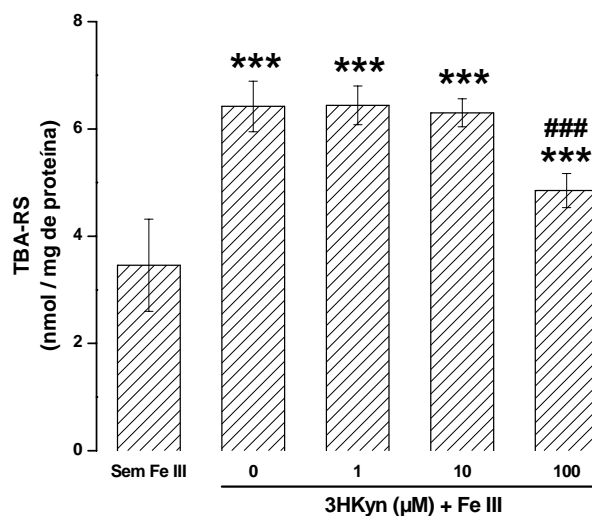


Figura IV. 3 – Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de 25 μM de íon férrico (Fe III) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média ± desvio padrão (n=6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (**p<0,001, comparado ao Sem Fe III; ###p<0,001, comparado ao 3HKyn 0 + Fe III).

IV. 1. 2 – Efeito *in vitro* da quinurenina (Kyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens

A figura IV. 4 mostra que a Kyn não alterou significativamente a medida das TBA-RS em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens [F(3,20)=0,716; $p>0,05$]. Também foram realizados experimentos com a adição de íon ferroso (Fe II) ou de íon férico (Fe III). As figuras IV. 5 e IV. 6 mostram que a Kyn não alterou significativamente as TBA-RS na presença de íon Fe II [F(4,25)=12,818; $p>0,05$] ou Fe III [F(4,24)=13,195; $p>0,05$], respectivamente. Além disso, pode-se verificar que a adição de íon Fe II ou Fe aumentou significativamente os valores de TBA-RS em cérebro de ratos jovens.

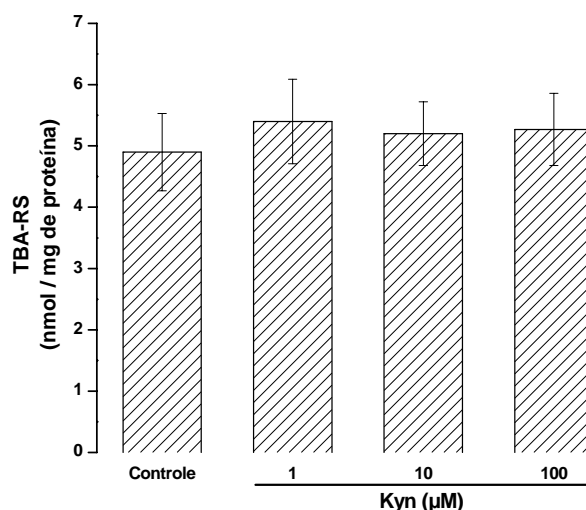


Figura IV. 4 – Efeito *in vitro* da quinurenina (Kyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio-padrão (n=6). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

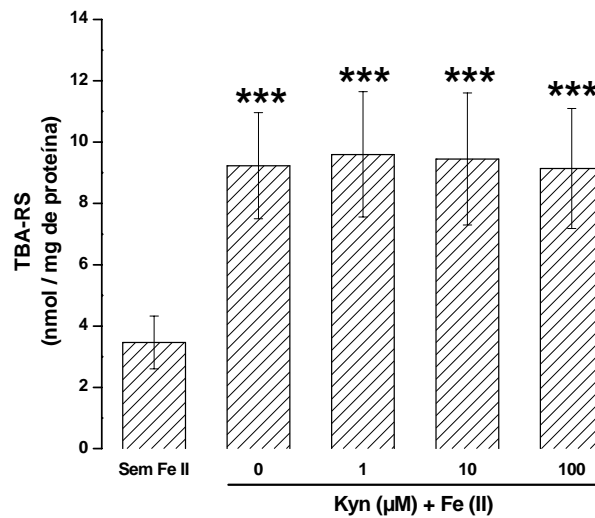


Figura IV. 5 – Efeito *in vitro* da quinurenina (Kyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de 25 μM de íon ferroso (Fe II) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média ± desvio-padrão (n=6). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). ***p<0,001, comparado ao Sem Fe II. Não houve diferença significativa entre os grupos contendo Fe II.

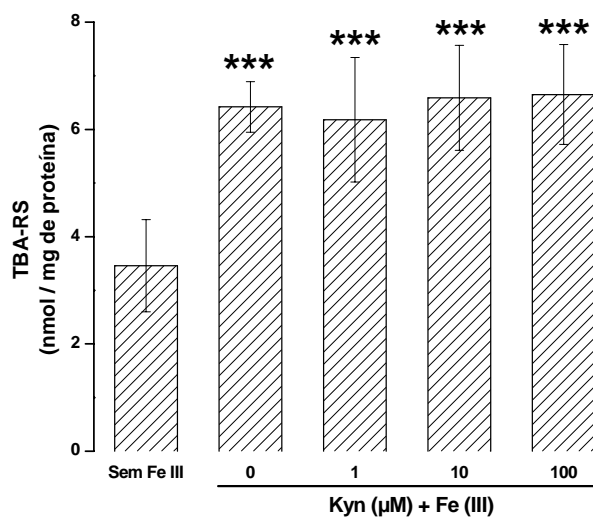


Figura IV. 6 – Efeito *in vitro* da quinurenina (Kyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de 25 μM de íon férrico (Fe III) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média ± desvio-padrão (n=5-6). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). *** $p < 0,001$, comparado ao Sem Fe III. Não houve diferença significativa entre os grupos contendo Fe III.

IV. 1. 3 – Efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxiacético (3HAA) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens

Como podemos observar na figura IV. 7, o 3HAA, na concentração de 100 μM , diminuiu significativamente a medida do TBA-RS [$F(3,20)=19,12$; $p<0,001$]. Considerando que estudos anteriores demonstraram a geração de espécies reativas de oxigênio pelo 3HAA, foram realizados experimentos na presença do íon ferroso (Fe II) com o objetivo de favorecer a reação de Fenton caso houvesse geração de peróxido de hidrogênio a partir do metabólito (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999). A figura IV. 8 mostra que o 3HAA, nas concentrações de 10 e 100 μM , diminuiu significativamente as TBA-RS, mesmo na presença de íon Fe II [$F(4,20)=77,726$; $p<0,001$]. Também foi verificado o efeito do 3HAA sobre a medida das TBA-RS na presença do íon férrico (Fe III), o qual teve por objetivo catalisar a reação de auto-oxidação do 3HAA e, conseqüentemente, haver a geração de espécies reativas (HIRAKU et al, 1995; DYKENS et al, 1987). A figura IV. 9 mostra que o 3HAA diminuiu significativamente as TBA-RS na presença do íon Fe III [$F(4,20)=17,408$; $p<0,001$] em córtex cerebral de ratos jovens. Observa-se também que, nas figuras IV. 8 e IV. 9, a presença dos íons Fe II e Fe III aumentou significativamente a medida das TBA-RS.

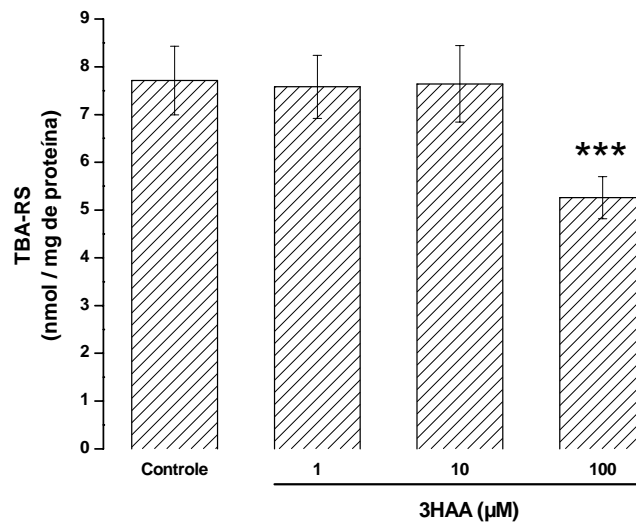


Figura IV. 7 – Efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio-padrão (n=6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (***) $p < 0,001$, comparado ao controle)

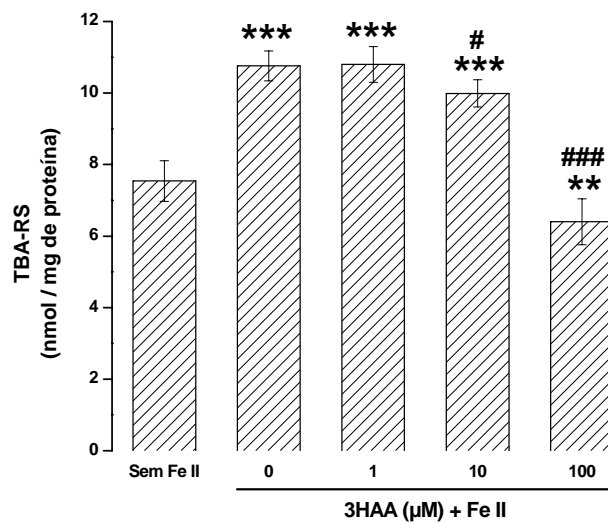


Figura IV. 8 – Efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA) sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de 25 μM de íon ferroso (Fe II) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média ± desvio-padrão (n=6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (**p<0,01, ***p<0,01, comparado ao Sem Fe II; #p<0,05, ###p<0,001, comparado ao 3HAA 0 + Fe II).

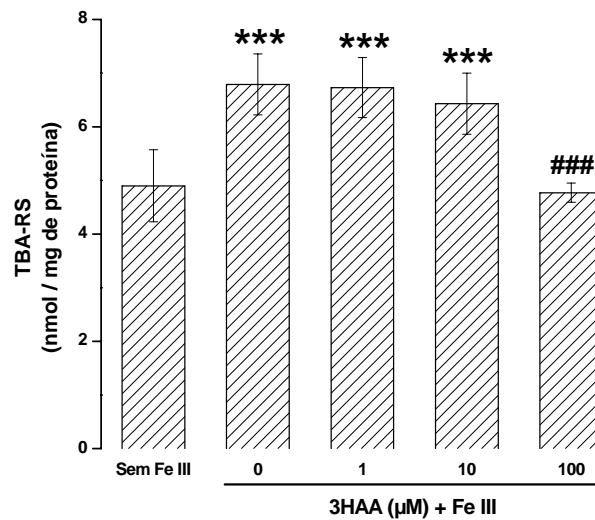


Figura IV. 9 – Efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de 25 μM de íon férrico (Fe III) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média ± desvio-padrão (n=6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (***) $p < 0,001$, comparado ao Sem Fe III; (###) $p < 0,001$, comparado ao 3HAA 0 + Fe III).

IV. 1. 4 – Efeito *in vitro* do ácido antranílico (AA) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens

A figura IV. 10 mostra que o AA não alterou significativamente as TBA-RS [F(3,20)=0,025; $p>0,05$]. Também foram realizados experimentos com a adição de íon ferroso (Fe II) ou de íon férico (Fe III). As figuras IV. 11 e IV. 12 mostram que o AA não alterou significativamente as TBA-RS na presença de íon Fe II [F(4,20)=49,715; $p<0,001$] ou Fe III [F(4,20)=11,057; $p<0,001$]. Observa-se também que, nas figuras IV. 11 e IV. 12, a presença dos íons Fe II e Fe III provocou um aumento significativo da medida das TBA-RS.

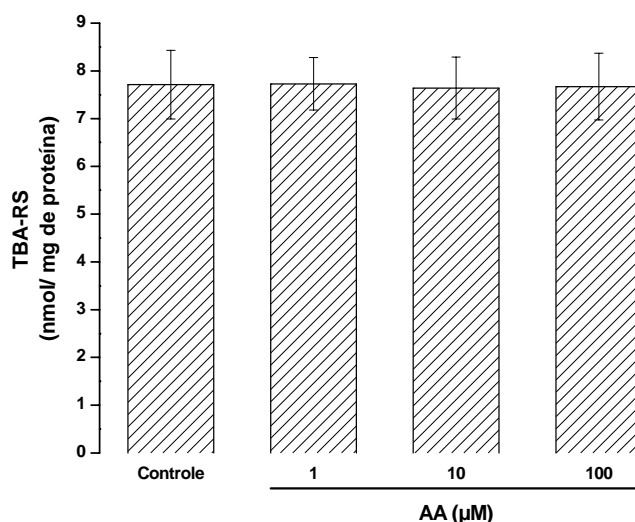


Figura IV. 10 – Efeito *in vitro* do ácido antranílico (AA) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio-padrão (n=6). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

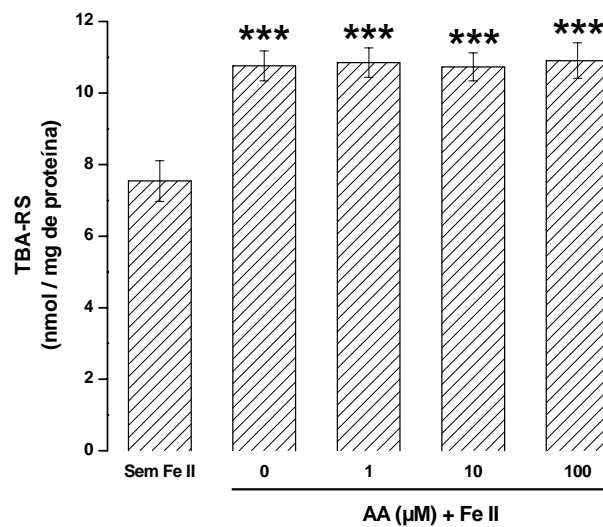


Figura IV. 11 – Efeito *in vitro* do ácido antranílico (AA) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de 25 μM de íon ferroso (Fe II) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média ± desvio-padrão (n=5). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). ***p<0,001, comparado ao Sem Fe II. Não houve diferença entre os grupos contendo Fe II.

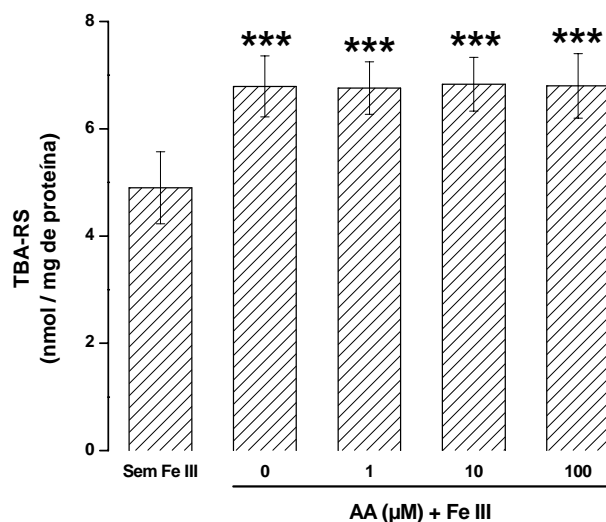


Figura IV. 12 – Efeito *in vitro* do ácido antranílico (AA) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de 25 μM de íon férrico (Fe III) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média ± desvio-padrão (n=5). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). ***p<0,001, comparado ao Sem Fe III. Não houve diferença significativa entre os grupos contendo Fe III.

IV. 1. 5 – Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (QA) sobre a medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens

A figura IV. 13 mostra que o QA, nas concentrações de 100 e 500 μM , aumentou significativamente as TBA-RS e que o efeito verificado é dose-dependente [$F(3,14)=92,454$; $p<0,001$] [$\beta=0,869$; $p<0,001$]. Considerando que estudos demonstraram que o efeito do QA sobre a peroxidação lipídica em cérebro de ratos é dependente de ferro, foram realizados experimentos onde foi adicionado 2 μM de íon ferroso (Fe II) e 250 μM de ácido ascórbico (ASC) a fim de verificar uma potencialização do efeito do QA sobre a peroxidação lipídica. A figura IV. 14 mostra que o QA, na concentração de 500 μM , aumenta as TBA-RS na presença de Fe (II) e ácido ascórbico [$F(4,20)=6,096$; $p<0,001$]. Também é importante salientar que a adição de 2 μM de íon Fe II e 250 μM de ASC não alterou significativamente os valores de TBA-RS em córtex cerebral de ratos jovens, quando comparado aos experimentos sem a presença de ferro (resultados não demonstrados).

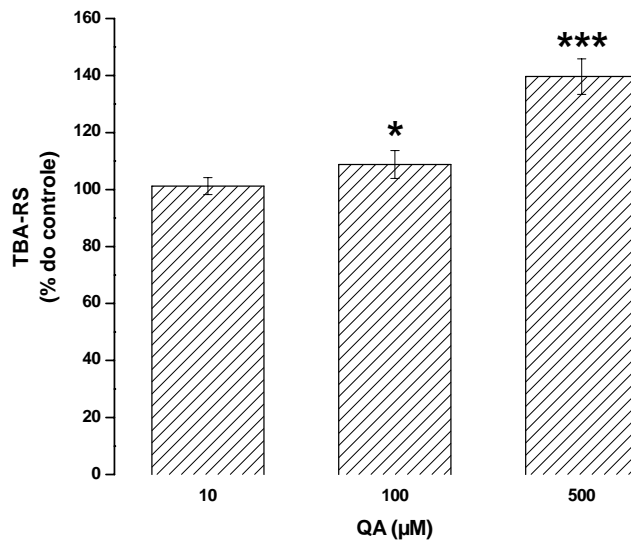


Figura IV. 13 – Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (QA) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio-padrão (n=4-5) e estão expressos como porcentagem do controle (2,44 nmol TBA-RS / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (*p<0,05, comparado ao controle; ***p<0,001, comparado ao controle).

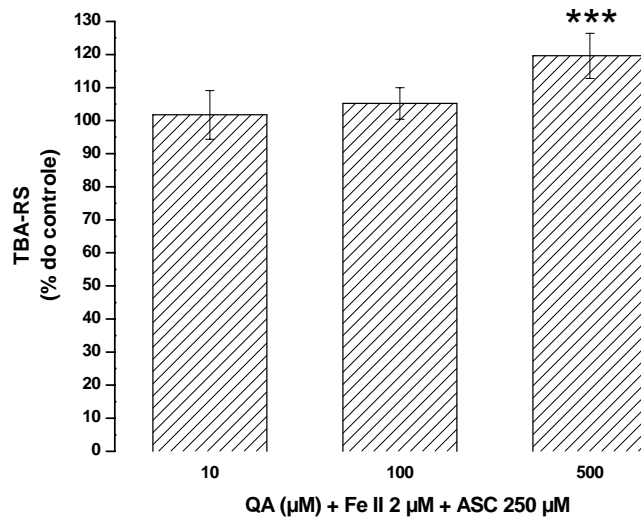


Figura IV. 14 – Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (QA) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de 2 μM de íon ferroso (Fe II) e 250 μM de ácido ascórbico (ASC) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média ± desvio-padrão (n=5) e estão expressos em porcentagem do controle (5,77 nmol TBA-RS / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (**p<0,001, comparado ao QA 0 + Fe II 2 μM + ASC 250 μM).

IV. 2 – Efeito *in vitro* dos metabólitos da via das quinureninas sobre a quimiluminescência em córtex cerebral de ratos jovens

IV. 2. 1 – Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre a quimiluminescência em córtex cerebral de ratos jovens

A figura IV. 15 mostra que a 3HKyn, na concentração de 100 μM , diminuiu significativamente a quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens [$F(3,12)=7,751$; $p<0,01$].

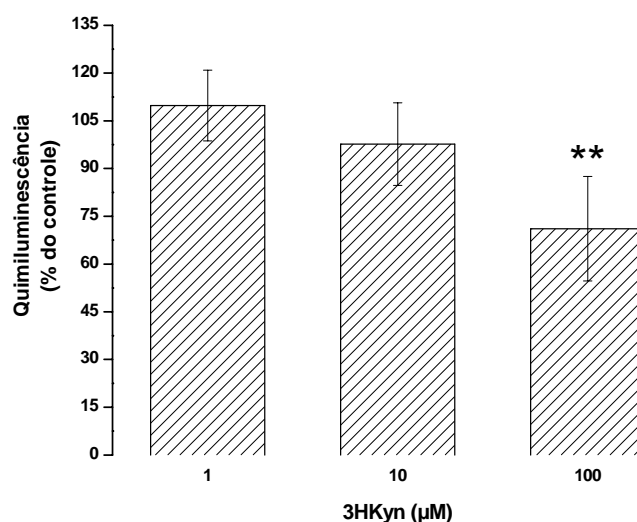


Figura IV. 15 – Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre a quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio-padrão ($n=4$) e estão expressos como porcentagem do controle (3336 cpm / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (** $p<0,01$).

IV. 2. 2 – Efeito *in vitro* da quinurenina (Kyn) sobre a quimiluminescência em córtex cerebral de ratos jovens

A figura IV. 16 mostra que a Kyn não exerceu nenhum efeito sobre a quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens [F(3,19)=0,144; p>0,05].

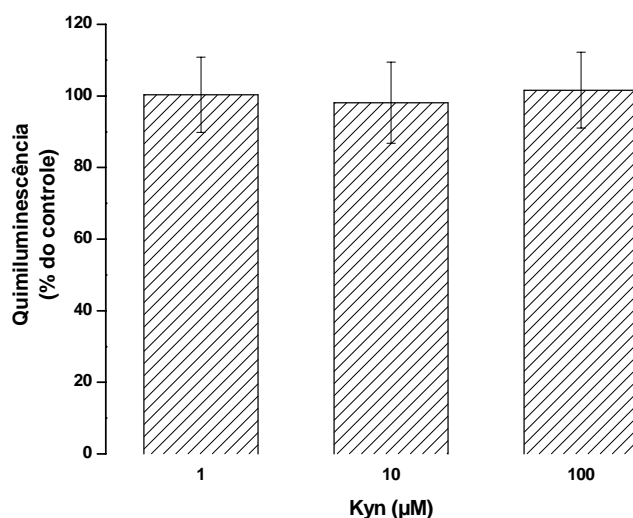


Figura IV. 16 – Efeito *in vitro* da quinurenina (Kyn) sobre a quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio-padrão (n=5-6) e estão expressos como porcentagem do controle (3034 cpm / mg de proteína). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

IV. 2. 3 – Efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA) sobre a quimiluminescência em córtex cerebral de ratos jovens

A figura IV. 17 mostra que o 3HAA, na concentração de 100 μM , diminuiu significativamente a quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens [$F(3,12)=10,64$; $p<0,01$].

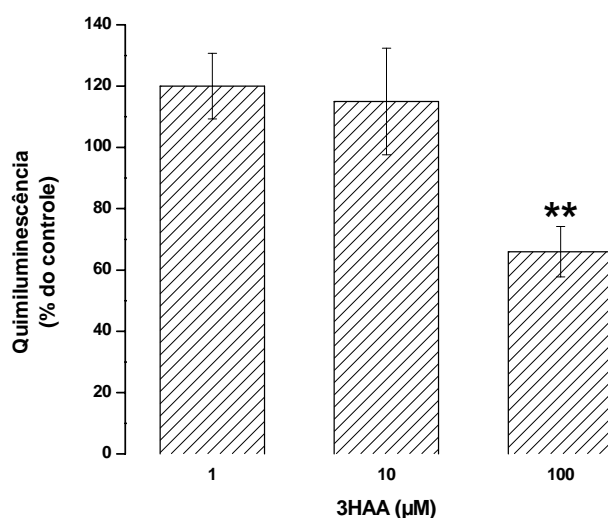


Figura IV. 17 – Efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA) sobre a quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio-padrão ($n=4$) e estão expressos como porcentagem do controle (3035 cpm / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (** $p<0,01$, comparado ao controle).

IV. 2. 4 – Efeito *in vitro* do ácido antranílico (AA) sobre a quimiluminescência em córtex cerebral de ratos jovens

A figura IV. 18 mostra que o AA não exerceu nenhum efeito sobre a quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens [F(3,12)=0,198; p>0,05].

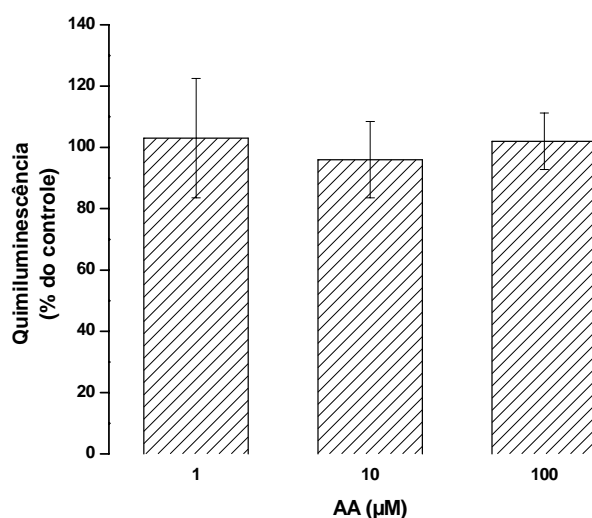


Figura IV. 18 – Efeito *in vitro* do ácido antranílico (AA) sobre a quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média ± desvio-padrão (n=4) e estão expressos como porcentagem do controle (3035 cpm / mg de proteína). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

IV. 2. 5 – Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (QA) sobre a quimiluminescência na ausência ou presença de íon ferroso (Fe II) e ácido ascórbico (ASC) em córtex cerebral de ratos jovens

A figura IV. 19 mostra que o QA, na concentração de 500 μM , aumentou significativamente a quimiluminescência e que esse efeito é dose-dependente [$F(3,12)=7,041$; $p<0,01$] [$\beta=0,766$; $p<0,001$]. Considerando que estudos anteriores demonstraram que o efeito do QA sobre a peroxidação lipídica em cérebro de ratos é dependente de ferro, foram realizados experimentos utilizando-se 2,0 μM de íon ferroso (Fe II) e 250 μM de ácido ascórbico (ASC) a fim de verificar uma potencialização do efeito do QA sobre a quimiluminescência. A figura IV. 20 mostra que, na presença de Fe II e ASC, o QA aumenta a quimiluminescência apenas na concentração de 500 μM , mostrando um padrão similar aos ensaios sem Fe II e ASC [$F(4,20)=13,501$; $p<0,001$]. Também foi verificado que a adição de 2 μM de íon Fe II e 250 μM de ASC aumentou significativamente a quimiluminescência, quando comparado aos experimentos sem a adição de ferro (resultados não demonstrados).

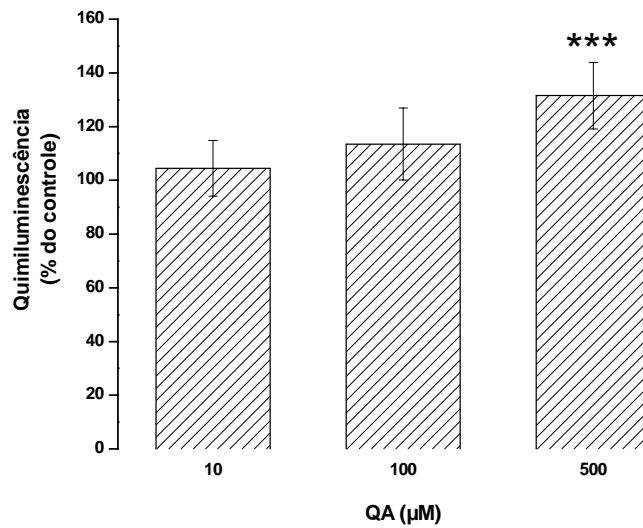


Figura IV. 19 – Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (QA) sobre a quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio-padrão (n=4) e estão expressos como porcentagem do controle (5507 cpm / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (**p<0,001, comparado ao controle)

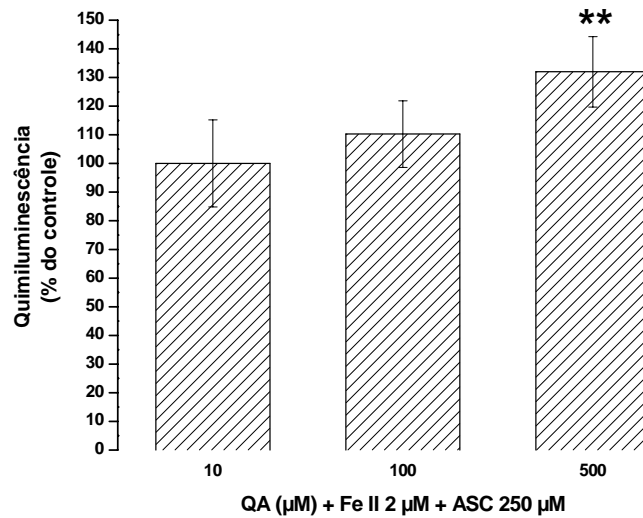


Figura IV. 20 – Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (QA) sobre a quimiluminescência na presença de 2,0 µM de íon ferroso (Fe II) e 250 µM de ácido ascórbico (ASC) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio-padrão (n=5) e estão expressos como porcentagem de controle (8295 cpm / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (**p<0,01, comparado ao QA 0 + Fe II + ASC).

IV. 3 – Efeito *in vitro* dos metabólitos da via das quinureninas sobre as concentrações de glutatona reduzida (GSH) em córtex cerebral de ratos jovens

IV. 3. 1 – Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as concentrações de glutatona reduzida (GSH) em córtex cerebral de ratos jovens

A figura IV. 21 mostra que a 3HKyn não alterou significativamente as concentrações de GSH em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens [F(4,30)=1,587; p>0,05].

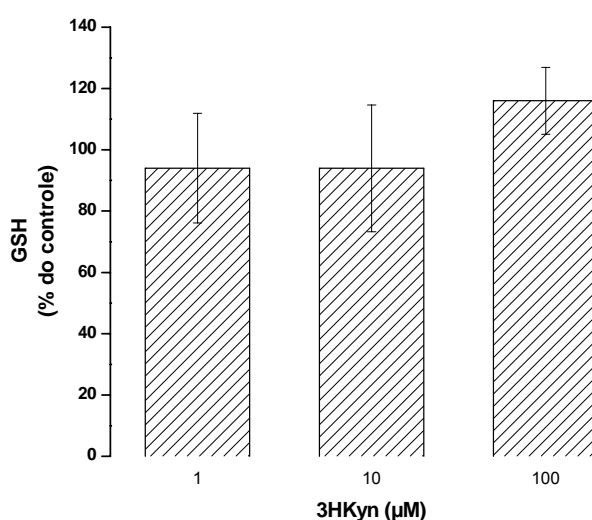


Figura IV. 21 – Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as concentrações de GSH em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio-padrão (n=7) e estão expressos como porcentagem do controle (13,39 nmol GSH / mg de proteína). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

IV. 3. 2 – Efeito *in vitro* da quinurenina (Kyn) sobre as concentrações de glutatona reduzida (GSH) em córtex cerebral de ratos jovens

A figura IV. 22 mostra que a Kyn não exerceu nenhum efeito sobre as concentrações de GSH em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens [F(4,26)=0,095; p>0,05].

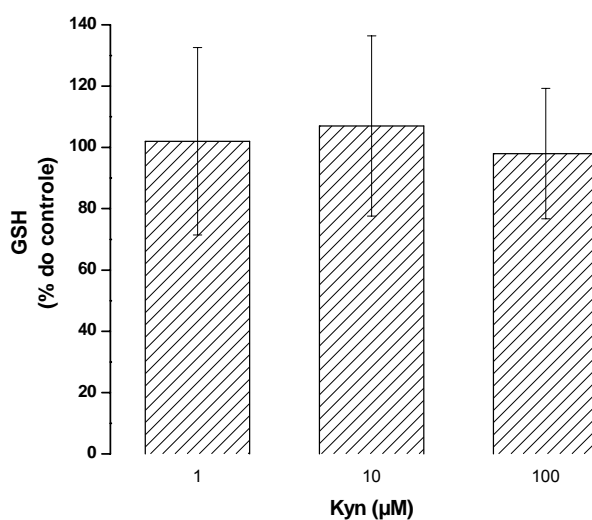


Figura IV. 22 – Efeito *in vitro* da quinurenina (Kyn) sobre as concentrações de GSH em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio-padrão (n=5-7) e estão expressos como porcentagem do controle (13,39 nmol GSH / mg de proteína). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

IV. 3. 3 – Efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA) sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em córtex cerebral de ratos jovens

A figura IV. 23 mostra que o 3HAA, na concentração de 100 μM , preveniu a oxidação da GSH em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens [F(3,26)=3,2122,040; $p<0,05$].

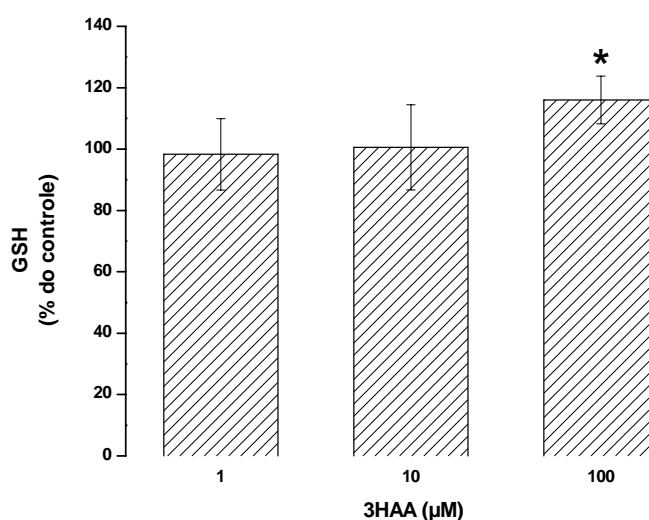


Figura IV. 23 – Efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA) sobre as concentrações de GSH em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio-padrão ($n=7-8$) e estão expressos como porcentagem do controle (13,89 nmol GSH / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan ($*p<0,05$, comparado ao controle).

IV. 3. 4 – Efeito *in vitro* do ácido antranílico (AA) sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em córtex cerebral de ratos jovens

A figura IV. 24 mostra que o AA não alterou significativamente as concentrações de GSH em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens [F(3,27)=1,11; p>0,05].

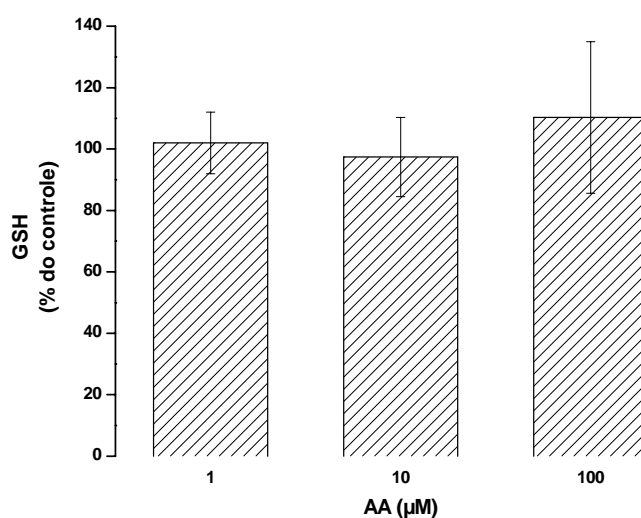


Figura IV. 24 – Efeito *in vitro* do ácido antranílico (AA) sobre as concentrações de GSH em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média ± desvio-padrão (n=7-8) e estão expressos como porcentagem do controle (27,23 nmol GSH / mg de proteína). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

IV. 3. 5 – Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (QA) sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) na ausência ou presença de íon ferroso (Fe II) e ácido ascórbico (ASC) em córtex cerebral de ratos jovens

A figura IV. 25 mostra que o QA não exerceu nenhum efeito sobre as concentrações de GSH em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens [F(3,12)=0,167; $p>0,05$]. Considerando que dados da literatura demonstraram que o efeito do QA sobre a peroxidação lipídica em cérebro de ratos é dependente de ferro, foram realizados experimentos utilizando-se 2 μM de íon ferroso (Fe II) e 250 μM de ácido ascórbico (ASC) a fim de verificar uma possível alteração nas concentrações de GSH causada pelo QA em córtex cerebral de ratos jovens. A figura IV. 26 mostra que o QA, na concentração de 500 μM , diminuiu significativamente as concentrações de GSH [F(4,15)=9,318; $p<0,05$]. Na presença de íon Fe II e ASC, as concentrações de GSH também diminuíram significativamente (resultados não demonstrados).

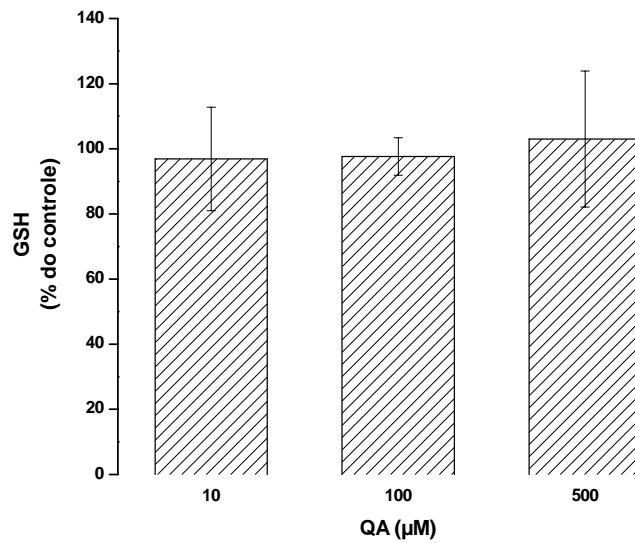


Figura IV. 25 – Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (QA) sobre as concentrações de GSH em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=4) e estão expressos com porcentagem do controle (14,2 nmol GSH / mg de proteína). O resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

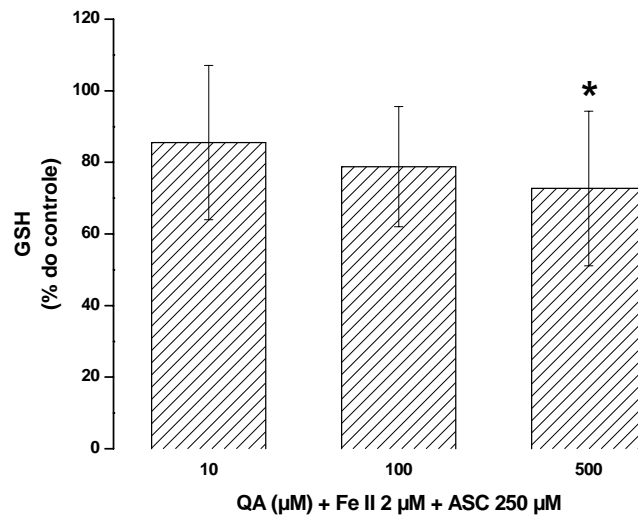


Figura IV. 26 – Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (QA) sobre as concentrações de GSH na presença de 2 μM de íon ferroso (Fe II) e 250 μM de ácido ascórbico em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média ± desvio padrão (n=4) e estão expressos como porcentagem do controle (16,56 nmol GSH / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (*p<0,05, comparado ao QA 0 + Fe II + ASC).

IV. 4 – Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina e da quinurenina sobre a oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) em córtex cerebral de ratos jovens

IV. 4. 1 – Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre a oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) em córtex cerebral de ratos jovens

A técnica da oxidação de DCFH-DA mede a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. As espécies reativas oxidam o DCFH-DA, formando o produto DCF, o qual produz fluorescência. A figura IV. 27 mostra que a 3HKyn, na concentração de 100 μM , diminuiu significativamente a oxidação do DCFH-DA em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens e que o efeito exercido pelo metabólito é dose-dependente [$F(3,20)=10,077$; $p<0,05$] [$\beta=0,757$; $p<0,001$]. Esse resultado sugere que a 3HKyn diminui a produção de espécies reativas em córtex cerebral de ratos jovens.

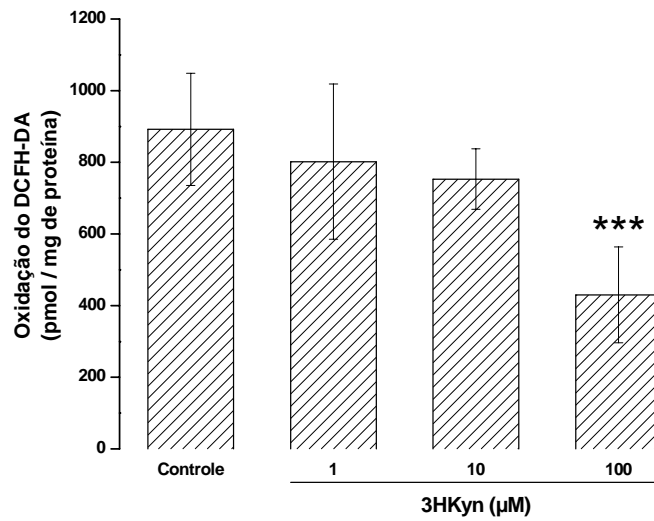


Figura IV. 27 – Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurena (3HKyn) sobre a oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio-padrão (n=6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (***) $p < 0,001$, comparado ao controle).

IV. 4. 2 – Efeito *in vitro* da quinurenina (Kyn) sobre a oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) em córtex cerebral de ratos jovens

A figura IV. 28 mostra que a Kyn não exerceu nenhum efeito sobre a oxidação do DCFH-DA em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens [F(3,12)=0,302; p>0,05].

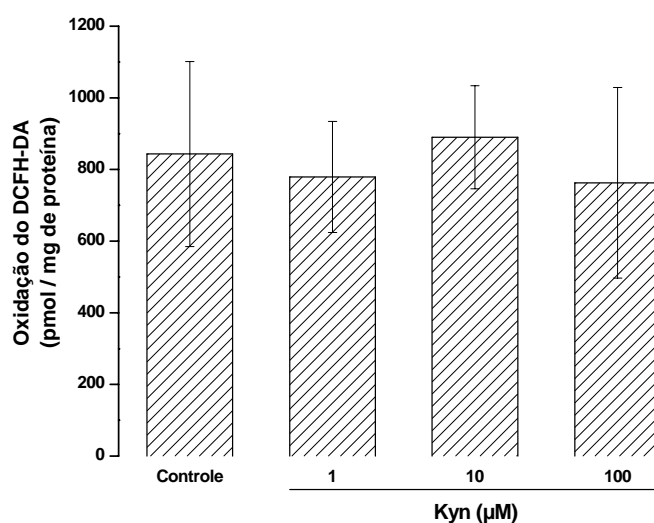


Figura IV. 28 – Efeito *in vitro* da quinurenina (Kyn) sobre a oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio-padrão (n=4). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

IV. 5 – Efeito dos metabólitos da via das quinureninas sobre a oxidação da 2-deoxi-D-ribose

IV. 5. 1 – Efeito da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre a oxidação da 2-deoxi-D-ribose

A oxidação da 2-deoxi-D-ribose mede a formação de radicais hidroxila. O sistema utilizado para a geração dessa espécie reativa consistiu de Fe III, ácido ascórbico (ASC) e peróxido de hidrogênio. Inicialmente, o íon Fe III é reduzido a íon Fe II pelo ASC. O íon Fe II, então, ao reagir com peróxido de hidrogênio, leva à formação dos radicais hidroxila. Com o objetivo de comprovar eficiência do sistema oxidante utilizado adicionou-se a enzima catalase, a qual, através da decomposição do peróxido de hidrogênio, diminui a formação dos radicais hidroxila. Em outro grupo não se adicionou íon ferroso (Fe II), o que também diminuiu a geração de radicais hidroxila devido à falta de catalisador para a reação de Fenton. A figura IV. 29 mostra que a 3HKyn, nas concentrações de 1, 10 e 100 μM , diminuiu significativamente a oxidação da 2-deoxi-D-ribose, o que sugere que a 3HKyn tem efeito antioxidante sobre os radicais hidroxila gerados no meio de reação [F(6,13)=90,208; $p<0,05$].

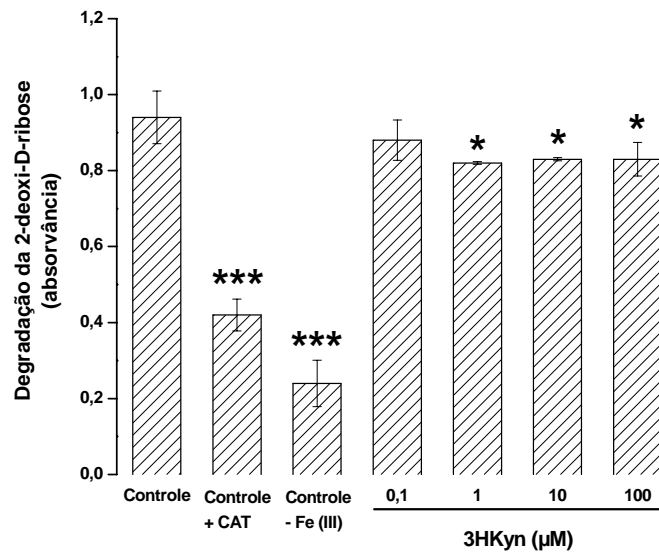


Figura IV. 29 – Efeito da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre a oxidação da 2-deoxi-D-ribose.

Os valores representam média \pm desvio-padrão (n=3). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, comparado ao controle).

IV. 5. 2 – Efeito da quinurenina (Kyn) sobre a oxidação da 2-deoxi-D-ribose

A figura IV. 30 mostra que a Kyn não diminuiu significativamente a oxidação da 2-deoxi-D-ribose, o que sugere que a Kyn não tem qualquer efeito sobre a formação do radical hidroxila [$F(4,10)=1,469$; $p>0,05$].

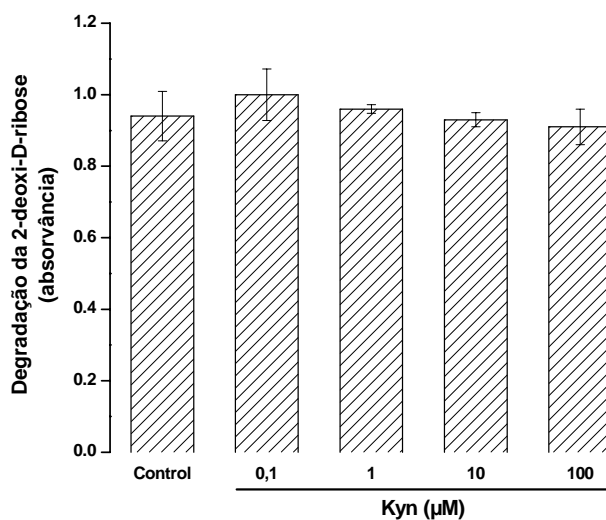


Figura IV. 30 – Efeito da quinurenina (Kyn) sobre a oxidação da 2-deoxi-D-ribose.

Os valores representam média \pm desvio-padrão ($n=3$). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

IV. 5. 3 – Efeito do ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA) sobre a oxidação da 2-deoxi-D-ribose

A figura IV. 31 mostra que o 3HAA não diminuiu significativamente a oxidação da 2-deoxi-D-ribose, o que sugere que o 3HAA não tem qualquer efeito sobre a formação do radical hidroxila [$F(4,10)=1,576$; $p>0,05$].

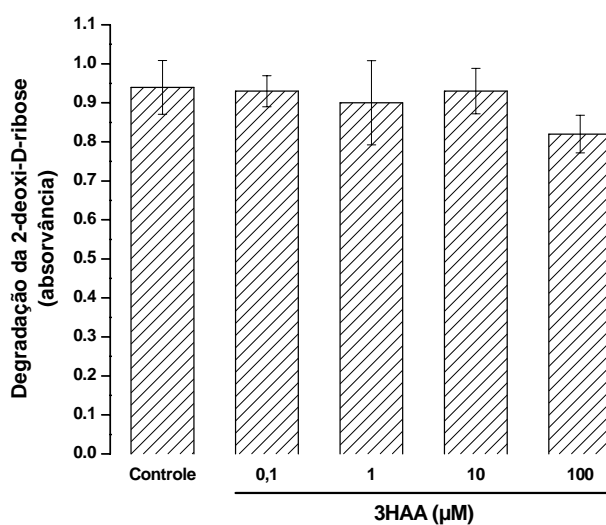


Figura IV. 31 – Efeito do ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA) sobre a oxidação da 2-deoxi-D-ribose.

Os valores representam média \pm desvio-padrão ($n=3$). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

IV. 5. 4 – Efeito do ácido antranílico (AA) sobre a oxidação da 2-deoxi-D-ribose

A figura IV. 32 mostra que o AA não diminuiu significativamente a oxidação da 2-deoxi-D-ribose, o que sugere que o AA não tem qualquer efeito sobre a formação do radical hidroxila [$F(4,10)=0,907$; $p>0,05$].

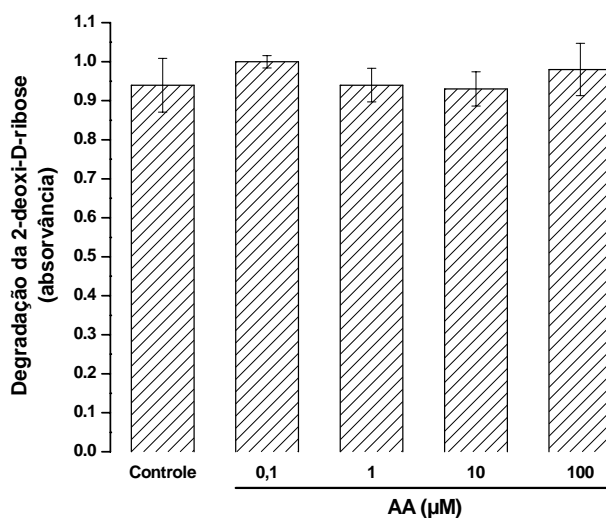


Figura IV. 32 – Efeito do ácido antranílico (AA) sobre a oxidação da 2-deoxi-D-ribose.

Os valores representam média \pm desvio-padrão (n=3). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

IV. 6 – Efeito da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) e do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HAA) sobre os radicais peroxila derivados do 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP)

Tendo em vista que os ensaios anteriores mostraram que a 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) e o ácido 3-hidroxi-antranílico (3HAA) apresentaram efeitos antioxidantes, verificou-se o efeito desses metabólitos sobre radicais peroxila derivados do 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP).

IV. 6. 1 – Efeito da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre os radicais peroxila gerados através da decomposição térmica do 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP)

Inicialmente, os radicais peroxila gerados por decomposição térmica do ABAP oxidam o luminol gerando quimiluminescência. Esta luminescência é considerada o valor inicial. O tempo de indução (TI) é o tempo necessário para a quimiluminescência retornar ao valor inicial, sendo que o TI é diretamente proporcional à atividade antioxidante do composto. A figura IV. 33 mostra que a 3HKyn apresentou efeito antioxidante sobre os radicais peroxila. Além disso, a 3HKyn pareceu ser melhor antioxidante que o Trolox (vitamina E hidrossolúvel), o qual é um seqüestrador clássico para esse tipo de radical livre, porque o tempo de indução apresentado pela 3HKyn na concentração de 100 μM nesse ensaio foi maior que o apresentado pelo Trolox em uma concentração três vezes maior (300 μM).

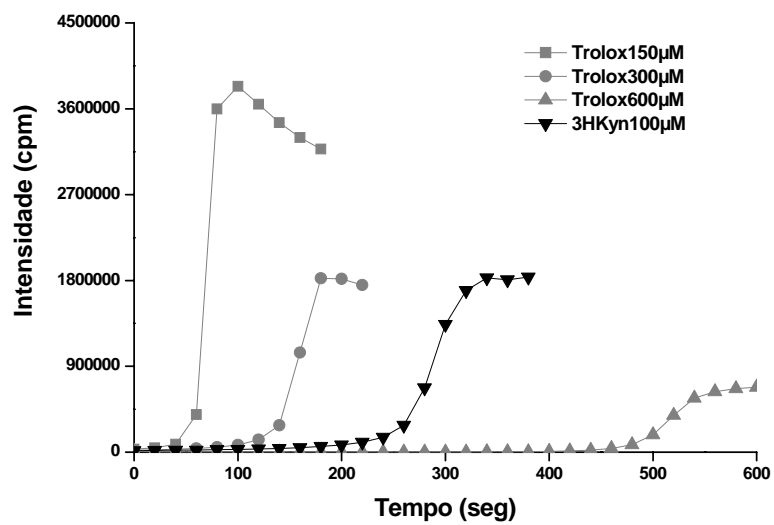


Figura IV. 33 – Efeito da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre os radicais peroxila derivados do 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP).

IV. 6. 2 – Efeito do ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA) sobre os radicais peroxila derivados do 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP)

A figura IV. 34 mostra que o 3HAA apresentou efeito antioxidante sobre os radicais peroxila, inclusive sendo melhor antioxidante que o Trolox (vitamina E hidrossolúvel), o qual é um seqüestrador clássico para esse tipo de radical livre, já que o tempo de indução apresentado pelo 3HAA na concentração de 100 μM foi maior que o apresentado pelo Trolox na concentração de 150 μM .

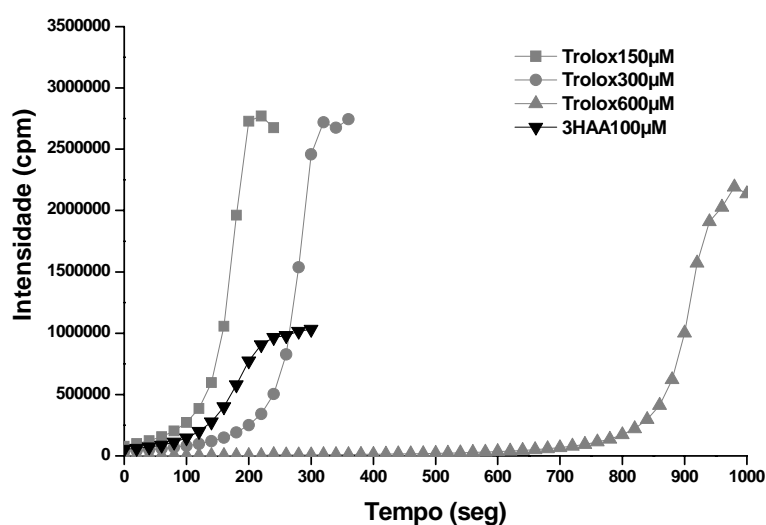


Figura IV. 34 – Efeito do ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA) sobre os radicais peroxila derivados do 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP).

IV. 7 – Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (QA) sobre o potencial antioxidante total (TRAP) em córtex cerebral de ratos jovens

Por outro lado, como o ácido quinolínico (QA) foi a única quinurenina testada a se mostrar um agente oxidante, estudou-se o efeito do mesmo sobre as defesas antioxidantes não-enzimáticas, medidas através do potencial antioxidante total (TRAP) e da reatividade antioxidante total (TAR), que reflete a capacidade do tecido de reagir rapidamente à formação de espécies reativas.

Como podemos observar na figura IV. 35, o QA diminuiu significativamente o TRAP na concentração de 500 μM em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens [$F(3,24)=3,805$; $p<0,01$].

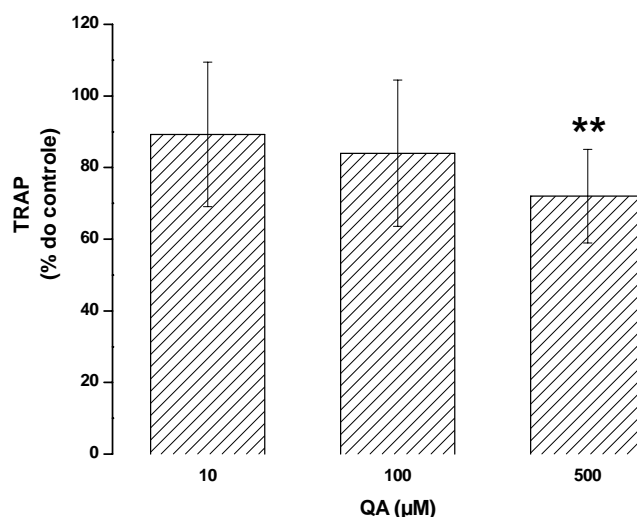


Figura IV. 35 – Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (QA) sobre o potencial antioxidante total (TRAP) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=7$) e estão expressos como porcentagem do controle (12,04 nmol Trolox / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (** $p<0,01$, comparado ao controle).

IV. 8 – Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (QA) sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em córtex cerebral de ratos jovens

A figura IV. 36 mostra que o QA causou uma significativa diminuição no TAR em todas as concentrações testadas em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens [F(3,15)=12,179; p<0,001].

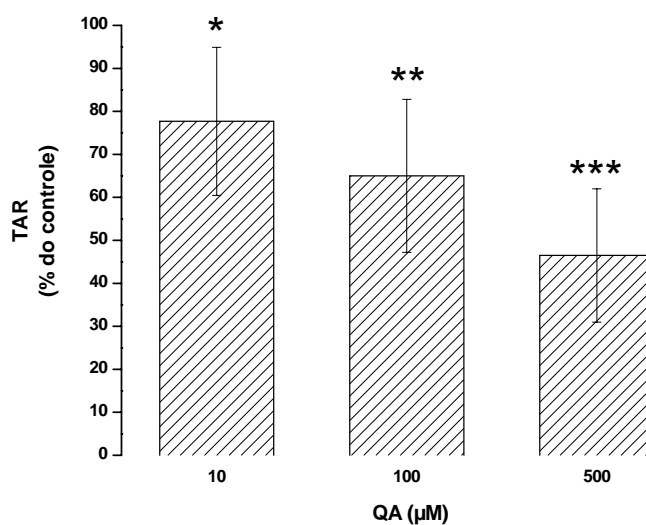


Figura IV. 36 – Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (QA) sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média ± desvio padrão (n=4-5) e estão expressos como porcentagem do controle (33,88 nmol Trolox / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, comparado ao controle).

IV. 9 – Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre a oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) e sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de ácido glutárico (GA) em córtex cerebral de ratos jovens

Uma hipótese recente postulou que as quinureninas têm um papel importante no dano cerebral de pacientes com acidemia glutárica tipo I. Nesta doença os ácidos glutárico (GA) e 3-hidroxiglutárico (HGA) estão acumulados. Considerando que o GA e o HGA são indutores de estresse oxidativo (DE OLIVEIRA MARQUES et al, 2003; LATINI et al., 2002, 2005), estudamos também o efeito da adição simultânea da 3HKyn com o GA e o HGA.

IV. 9. 1 – Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre a oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) na presença de ácido glutárico (GA) em córtex cerebral de ratos jovens

A figura IV. 37 mostra que a 3HKyn, em todas as concentrações testadas preveniu o aumento na produção de espécies reativas causado por 1 mM de GA. Verificou-se também que na concentração de 100 μ M, a 3HKyn inibiu significativamente per se a oxidação do DCFH-DA, evidenciando um efeito antioxidante potente [F(7,24)=7,74; p<0,05].

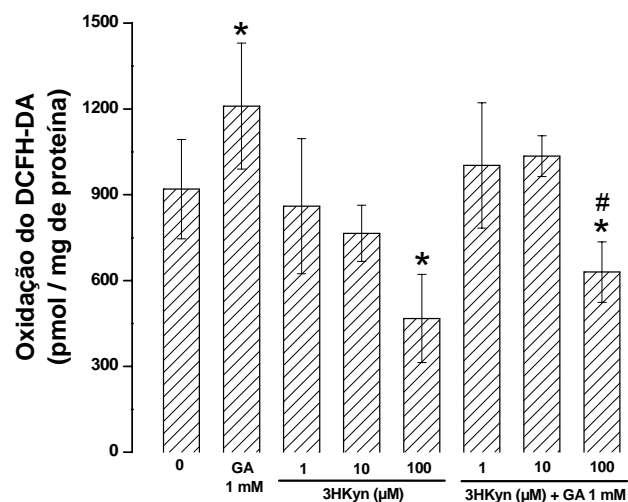


Figura IV. 37 – Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinureína (3HKyn) sobre a oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) na presença de ácido glutárico (GA) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=4). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (*p<0,05, comparado ao controle; #p<0,05, comparado ao GA 1 mM).

IV. 9. 2 – Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de 1 mM de ácido glutárico (GA) em córtex cerebral de ratos jovens

Como podemos observar na figura IV. 38, a 3HKyn, na concentração de 100 μ M, reduziu os valores de TBA-RS, bem como preveniu o aumento de lipoperoxidação causado por 1 mM de GA [F(9, 44)= 16.057; p<0.001].

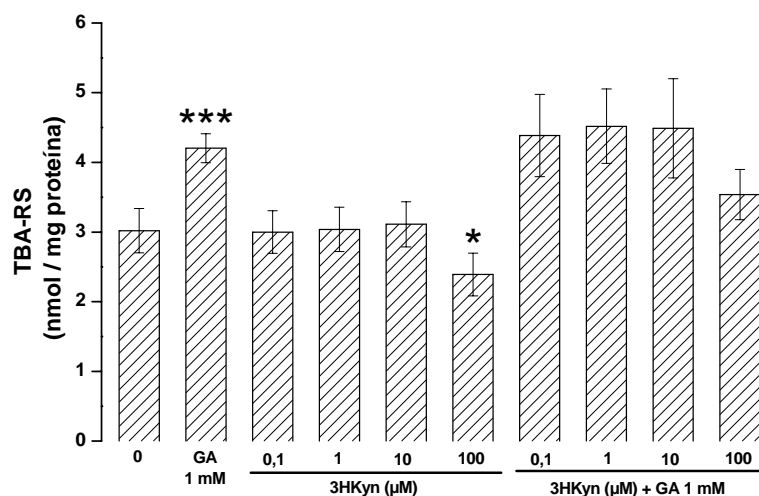


Figura IV. 38 – Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de ácido glutárico (GA) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=4-6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (*p<0,05, ***p<0,001, comparado ao controle).

IV. 10 – Efeito in vitro da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença simultânea de 1 mM de ácido glutárico (GA) e 1 mM de ácido 3-hidroxi glutárico (HGA) ou na presença de GA, HGA e ácido quinolínico (QA), nas concentrações de 10 ou 500 μ M em córtex cerebral de ratos jovens

A figura IV. 39 demonstra uma diminuição significativa das TBA-RS pela 3HKyn na concentração de 100 μ M. Podemos também observar um efeito aditivo do GA e do HGA, o qual também foi prevenido pela presença de 3HKyn. Além disso, se pode verificar um aumento dos valores das TBA-RS causado pelo QA na concentração de 500 μ M e ainda um efeito aditivo desse metabólito quando co-incubado com GA e HGA. Esse efeito aditivo dos três metabólitos no aumento das TBA-RS também foi prevenido pela 3HKyn.

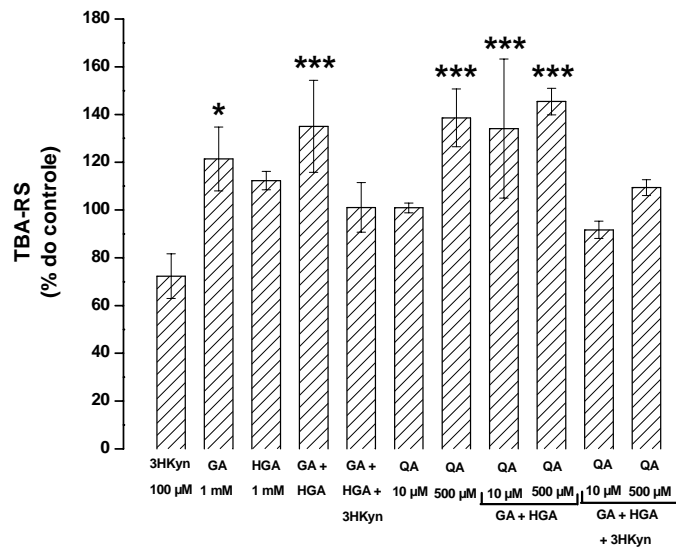


Figura IV. 39 – Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de ácido glutárico (GA) e ácido 3-hidroxi glutárico (HGA) ou na presença de ácido quinolínico (QA) quando co-incubado com GA e HGA em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=4-5) e estão expressos como porcentagem do controle (4,91 nmol TBA-RS / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (*p<0,05; ***p<0,001, comparado ao controle).

IV. 11 – Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de ácido quinolínico (QA) em córtex cerebral de ratos jovens

Visto que o presente trabalho demonstrou um efeito antioxidante da 3HKyn e pró-oxidante do QA, ambos metabólitos da via das quinureninas, também foi verificado o efeito da 3HKyn sobre as TBA-RS na presença do QA. A figura IV. 40 mostra que a 3HKyn, na concentração de 100 μ M diminuiu as TBA-RS e o QA aumentou essa medida na concentração de 500 μ M. Verificamos também que o 3HKyn preveniu a lipoperoxidação induzida pelo QA na concentração de 100 μ M, sugerindo mecanismos compensatórios desses metabólitos quando encontrados acumulados.

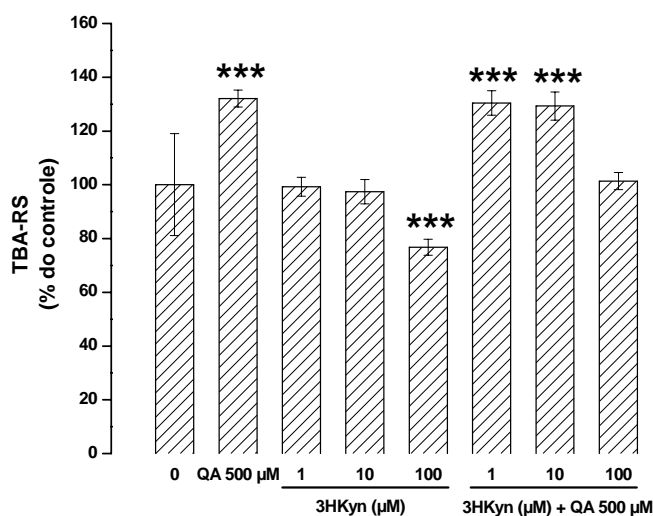


Figura IV. 40 – Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de ácido quinolínico (QA) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=5) e estão expressos como porcentagem do controle (5,63 nmol TBA-RS / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (***) $p < 0,001$, comparado ao controle).

IV. 12 – Efeito do tempo de exposição (1-48 horas) à 100 μ M de 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em homogeneizado de células C6 cultivadas.

IV. 12. 1 Efeito do tempo de exposição (1-48 horas) à 100 μ M de 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de células C6 cultivadas.

Podemos observar que 100 μ M de 3HKyn diminuiu significativamente os valores de TBA-RS quando as células C6 foram expostas ao metabólito nos tempos de 1 ou 6 horas (tempo de exposição: 1 hora, $t_{(5)}=4.61$; $p<0,05$; 6 horas, $t_{(5)}=44.08$; $p<0,001$). Por outro lado, em tempos de exposição mais longos, a 3HKyn não provocou nenhum efeito significativo sobre esse parâmetro (Figura IV. 41).

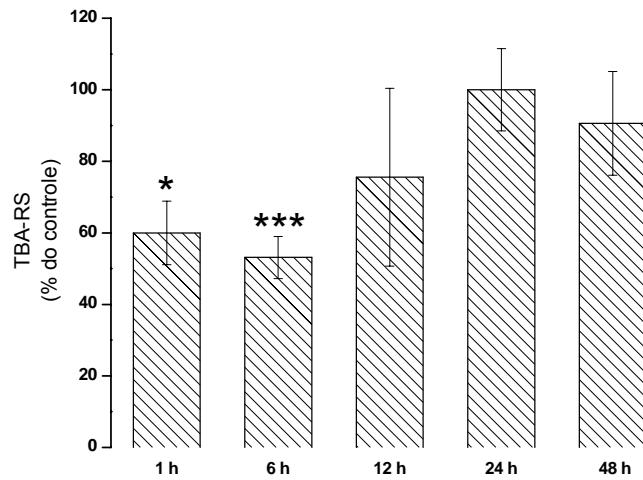


Figura IV. 41 – Efeito da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de células C6 cultivadas em diferentes tempos de exposição (1-48 horas).

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=3) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle 1 h: $0,301 \pm 0,092$; Controle 6 h: $0,032 \pm 0,007$; Controle 12h: $0,585 \pm 0,214$; Controle 24h: $0,514 \pm 0,196$; Controle 48h: $0,320 \pm 0,035$; Unidade: nmol TBA-RS / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por teste t Student para amostras pareadas (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, comparado ao controle).

IV. 12. 2 – Efeito do tempo de exposição (1-48 horas) à 100 μ M de 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre reatividade antioxidante total (TAR) em homogeneizado de células C6 cultivadas.

Através da figura IV. 42 podemos verificar que 100 μ M de 3HKyn aumentou significativamente os valores de TAR (tempos de incubação: 1 hora, $t_{(2)} = -14,73$; $p < 0,01$; 6 horas, $t_{(2)} = -6,96$; $p < 0,05$) e que esses valores diminuíram gradualmente em tempos de exposição mais longos [$F = 29,06$; $p < 0,001$; $\beta = -0,83$; $p < 0,001$].

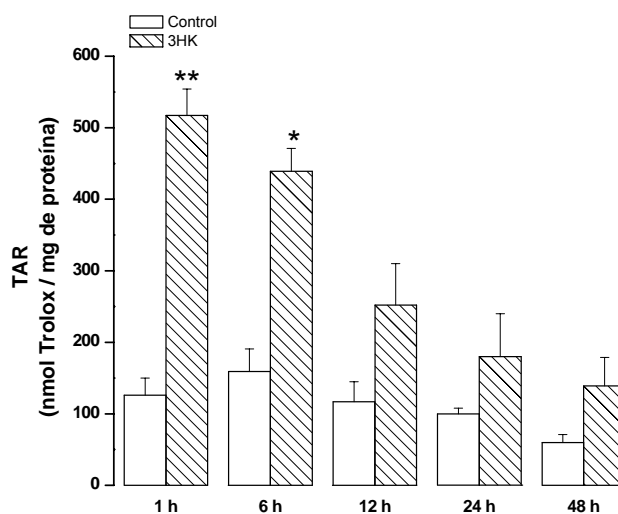


Figura IV. 42 – Efeito da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em homogeneizado de células C6 cultivadas em diferentes tempos de exposição (1-48 horas).

Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=3$). A diferença entre as médias foi calculada por teste t Student para amostras pareadas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, comparado ao controle).

IV. 12. 3 – Efeito da exposição à 100 μM de 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) por 48 horas sobre a morfologia de células C6 cultivadas.

Podemos observar que 100 μM de 3HKyn não provocou qualquer alteração na morfologia das células C6 após 48 horas de tempo de exposição (Figura IV. 43).

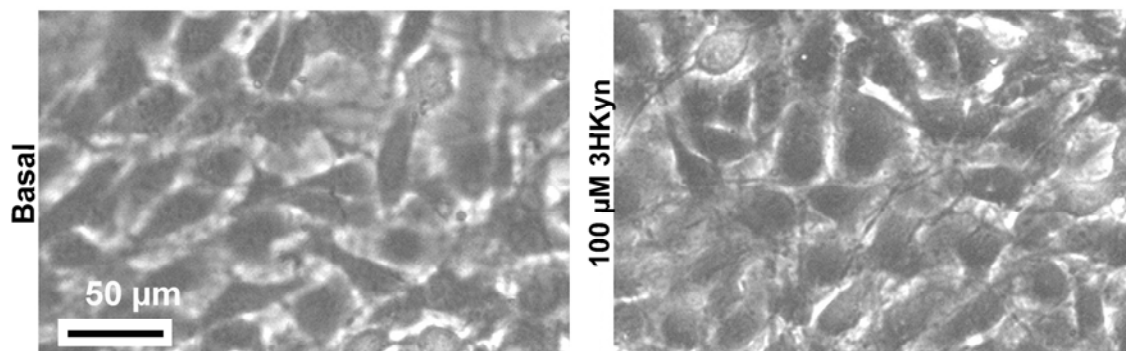


Figura IV. 43 – Efeito da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) em um tempo de exposição de 48 horas sobre a morfologia de células C6 cultivadas.

V DISCUSSÃO

A via das quinureninas tem crescido em interesse recentemente, visto que muitos dos intermediários dessa via apresentam importantes atividades biológicas. Assim, foi demonstrado que as quinureninas desempenham papel relevante no comportamento, no sono, na termoregulação e na gestação. No entanto, pouco se sabe a respeito dos mecanismos de ação desses compostos (STONE, 1993; CURZON, 1996). Além disso, sabe-se que algumas dessas substâncias estão relacionadas à resposta imune, sendo capazes de induzir a expressão de várias citocinas, quimiocinas e seus receptores, promovendo a inflamação (GUILLEMIN et al., 2002). No cérebro, são principalmente produzidas nas células da microglia, estando relacionadas à resposta inflamatória do SNC.

Dentre as várias quinureninas, o ácido quinolínico (QA), a 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) e o ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA) têm sido apontados como os de maior toxicidade. Diversos estudos evidenciaram que o QA é um agonista dos receptores do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (STONE et al., 1993; STONE e PERKINS, 1981; TSUZUKI et al., 1989; KIM e CHOI, 1987; SCHWARCZ et al., 1983), sugerindo um papel importante desse metabólito na neurotransmissão glutamatérgica. Portanto, uma alteração na rota das quinureninas pode ocasionar um aumento ou decréscimo da neurotransmissão glutamatérgica, acarretando conseqüências importantes para a neuroplasticidade. Nesse contexto, fármacos que atuem nessa via estão sendo desenvolvidos para o tratamento de diversas enfermidades do sistema nervoso central.

Por outro lado, vários estudos demonstraram que o QA, a 3HKyn e o 3HAA são compostos geradores de espécies reativas de oxigênio. Também foi observado que tanto a 3HKyn quanto o 3HAA são capazes de reduzir a viabilidade celular (EASTMAN e GUILARTE, 1989; OKUDA et al., 1996, 1998; CHIARUGI et al., 2001; LEE et al., 2004; GOLDSTEIN et al., 2000) mediada por apoptose, possivelmente através da formação de espécies reativas de oxigênio provenientes da auto-oxidação desses compostos, resultando na formação do peróxido de hidrogênio e do radical hidroxila (HIRAKU et al, 1995; DYKENS et al, 1987, 1989;

OKUDA et al., 1996, 1998; CHIARUGI et al., 2001; CERSTIAENS et al., 2003; LEE et al., 2004).

No entanto, outros estudos demonstraram que os intermediários *orto*-aminofenólicos da via das quinureninas apresentam efeito antioxidante sobre radicais peroxila, bem como co-antioxidante, já que regeneram α -tocoferol, através da redução do radical α -tocoferil, o qual é o principal agente antioxidante responsável por impedir a peroxidação lipídica da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (CHRISTEN et al., 1990, 1994; THOMAS et al., 1996). Esses investigadores sugerem que o aumento na síntese desses compostos em situações patogênicas poderia ser um mecanismo de defesa do organismo (CHRISTEN et al., 1990, 1994; THOMAS et al., 1996).

Recentemente, os metabólitos da via das quinureninas têm sido associados a várias doenças neurodegenerativas com envolvimento de estresse oxidativo, tais como as doenças de Huntington, Alzheimer, Parkinson, a demência associada à AIDS, e a acidemia glutárica tipo I, apesar de não se conhecer o papel exato das quinureninas na fisiopatologia dessas enfermidades.

Tendo em vista os resultados aparentemente controversos sobre o efeito das quinureninas sobre a geração de espécies reativas (pró-oxidantes ou antioxidantes) e, considerando que as concentrações cerebrais de algumas quinureninas estão elevadas em doenças neurodegenerativas em que o estresse oxidativo parece ser um importante mecanismo fisiopatogênico, este trabalho teve por objetivo investigar os efeitos *in vitro* do QA, da 3HKyn e do 3HAA, bem como de seus análogos estruturais Kyn e AA, sobre parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens.

Verificamos inicialmente que a 3HKyn e o 3HAA, na concentração de 100 μ M, diminuíram significativamente as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), uma medida de peroxidação lipídica, indicando, portanto, um efeito antioxidante desses compostos. Esse efeito também foi verificado na presença de íon ferroso (Fe II), que favorece a reação de Fenton e a conseqüente geração de radicais hidroxila e de íon férrico (Fe III), que por sua vez, favorece a reação de auto-oxidação da 3HKyn e do 3HAA, confirmando a atividade antioxidante de

ambos os metabólitos. Por outro lado, a quinurenina (Kyn) e o ácido antranílico (AA), análogos estruturais da 3HKyn e do 3HAA, respectivamente, não alteraram significativamente os níveis de TBA-RS na ausência ou na presença dos íons Fe II ou Fe III, indicando uma especificidade de efeito. É possível, portanto, que a presença da hidroxila no carbono 3 da 3HKyn e do 3HAA seja essencial para a atividade antioxidante demonstrada.

Posteriormente, estudamos os efeitos da 3HKyn, do 3HAA, da Kyn e do AA sobre a quimiluminescência, outro parâmetro de peroxidação lipídica, em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens. A 3HKyn e o 3HAA, ambos na concentração de 100 μ M, diminuíram significativamente a quimiluminescência, enquanto a Kyn e o AA não tiveram efeito sobre esse parâmetro. Os resultados de quimiluminescência confirmam o efeito antioxidante da 3HKyn e do 3HAA diminuindo a peroxidação lipídica normal do tecido. Tomados em seu conjunto, esses resultados sugerem que apenas os metabólitos com estrutura *orto*-aminofenólica apresentaram efeito antioxidante, estando de acordo com estudos anteriores que demonstraram que os metabólitos do triptofano com essa estrutura química característica, tais como a 3HKyn, o 3HAA, o 5-hidroxitriptofano e o ácido xanturênico, tinham a capacidade de proteger lipossomos de fosfatidilcolina e ficoeritrina B da oxidação por radicais livres, além de regenerar o α -tocoferol, antioxidante responsável pela proteção das LDL contra peroxidação lipídica (CHRISTEN et al., 1990, 1994; THOMAS et al., 1996).

A seguir, testamos o efeito da 3HKyn, do 3HAA, da Kyn e do AA sobre a concentração de glutathiona reduzida (GSH), o principal antioxidante endógeno responsável pela proteção dos grupamentos tióis de proteínas, em córtex cerebral de ratos. Mostramos que a concentração de GSH, na presença de 100 μ M de 3HAA, apresentou um valor superior do que aqueles grupos em que foram adicionadas a 3HKyn, a Kyn e o AA. Tais resultados sugerem que o 3HAA preveniu significativamente a oxidação do GSH contido no homogeneizado de córtex cerebral utilizado na incubação, atuando como um agente antioxidante.

Investigamos também o efeito da 3HKyn e da Kyn sobre oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA). Os resultados demonstram que

a 3HKyn reduziu significativamente a oxidação do DCFH-DA, o que sugere que o metabólito diminuiu a produção e/ou quantidade de espécies reativas no meio, provavelmente por possuir uma ação seqüestradora de espécies reativas. Entretanto, não foi possível determinarmos a especificidade de ação da 3HKyn através dessa técnica, já que o DCFH-DA pode ser oxidado por diferentes espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Por outro lado, a Kyn não alterou os valores de oxidação do DCFH-DA, indicando que a mesma não possui ação pró-oxidante ou antioxidante.

Estudamos então a especificidade do efeito antioxidante apresentado pela 3HKyn e pelo 3HAA. Assim, foram testados os efeitos da 3HKyn e do 3HAA, bem como da Kyn e do AA para medidas comparativas, sobre radicais peroxila gerados a partir da decomposição térmica do 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP). Os resultados demonstraram que tanto a 3HKyn quanto o 3HAA tiveram efeito antioxidante sobre os radicais peroxila gerados, e que tais efeitos foram maiores que o do Trolox (vitamina E hidrossolúvel), o qual é um antioxidante clássico para esse radical. Esses achados também estão de acordo com estudos prévios que demonstraram que concentrações equimolares de 3HKyn e de 3HAA foram mais eficientes que o Trolox na proteção de lipossomos de fosfatidilcolina e ficoeritrina B contra a oxidação causada por radicais peroxila (CHRISTEN et al., 1990, 1994; THOMAS et al., 1996). Em contrapartida, a Kyn e o AA não tiveram nenhum efeito sobre os radicais peroxila.

Ainda estudando a especificidade do efeito antioxidante da 3HKyn e do 3HAA, testamos o efeito desses compostos, bem como da Kyn e do AA, sobre a oxidação da 2-deoxi-D-ribose. Os resultados demonstraram que apenas a 3HKyn diminuiu significativamente a oxidação da 2-deoxi-D-ribose, o que sugere que a 3HKyn também possui uma atividade seqüestradora sobre radicais hidroxila.

No entanto, outros estudos demonstraram que a 3HKyn e o 3HAA são tóxicos para neurônios estriatais, bem como para células neuronais híbridas e células derivadas de macrófagos, provavelmente devido à geração de espécies reativas de oxigênio (OKUDA et al., 1996, 1998; EASTMAN e GUILARTE, 1989, 1990), o que está em desacordo com os resultados da presente investigação.

Okuda et al. (1996, 1998) verificaram que a 3HKyn e o 3HAA são tóxicos para culturas de neurônios estriatais de ratos Wistar em concentrações baixas (1-100 μ M). Também foi demonstrado que a enzima catalase e o quelante de ferro desferroxiamina preveniram a toxicidade da 3HKyn, sugerindo que a geração de peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila estejam envolvidos nesse dano oxidativo. O mesmo estudo evidenciou uma seletividade da ação tóxica do 3HKyn para neurônios corticais e estriatais, enquanto neurônios do cerebelo e hipocampo não foram afetados pela 3HKyn, a qual pode ser explicada pela resistência dos diferentes tipos de neurônios ao estresse oxidativo ou por diferenças na captação do metabólito pelas várias células. Essas diferenças com relação aos nossos resultados poderiam ser explicadas, ao menos em parte, pelo tempo de exposição do tecido à 3HKyn. As culturas estriatais foram expostas à 3HKyn durante 24 ou 48 horas, tempo de exposição muito maior do que o testado em nosso estudo, onde foi feita uma pré-incubação das quinureninas com os homogeneizados de córtex cerebral por apenas 1 hora. É possível, portanto, que a geração de espécies reativas a partir da reação de auto-oxidação da 3HKyn (DYKENS et al., 1987, 1989) seja dependente de um tempo maior de exposição do que o utilizado em nossos experimentos.

Outros trabalhos também demonstraram ações oxidantes da 3HKyn e do 3HAA provocando dano em proteínas (GOLDSTEIN et al., 2000). Esses investigadores mostraram que a 3HKyn e o 3HAA reduzem os íons cúprico (Cu II) e férrico (Fe III). Com a redução do íon Cu II à cuproso (Cu I), ocorre simultaneamente a geração de espécies reativas, particularmente o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio. O mesmo estudo não verificou nenhuma alteração nos valores de TBA-RS, sugerindo que a geração de espécies reativas com capacidade de causar peroxidação lipídica, principalmente radicais hidroxila que podem se formados através da reação de Fenton, não estariam envolvidas nesse dano. É possível que a geração de espécies reativas não encontrada em nosso estudo pode ser, provavelmente, devido à ausência de cobre no meio (utilizamos apenas suplementação de ferro). Portanto, é possível que a 3HKyn e o

3HAA possam simultaneamente atuar agudamente como antioxidantes e cronicamente (período longo) como pró-oxidantes na presença de íons Cu II.

Com o objetivo de elucidar se o tempo de exposição poderia estar relacionado com uma ação antioxidante ou pró-oxidante das quinureninas com estrutura *orto*-aminofenólica, determinamos a reatividade antioxidante total (TAR) e os valores de TBA-RS em células C6 cultivadas expostas por períodos variáveis à 3HKyn. Observamos que o tratamento dessas células à 3HKyn por períodos curtos de tempo (1-6 horas) resultou em uma diminuição da TAR, indicando uma ação antioxidante da droga. No entanto, tempos maiores de exposição (12-48 horas) resultaram em uma diminuição progressiva da ação antioxidante da 3HKyn. Além disso, os valores de TBA-RS também foram significativamente reduzidos quando as células C6 cultivadas foram expostas à 3HKyn por curtos períodos de tempo (1-6 horas). Enquanto não houve diferença significativa nos valores de TBA-RS em relação aos controles em períodos mais longos de exposição (12-48 horas). Esses achados sugerem que a capacidade antioxidante da 3HKyn diminui ao longo do tempo, o que pode dever-se à degradação da 3HKyn com uma perda progressiva de sua capacidade antioxidante. Por outro lado, não se pode descartar que ocorra auto-oxidação da 3HKyn com concomitante formação de espécies reativas ao longo do tempo (ação pró-oxidante), podendo agir simultaneamente com capacidade pró-oxidante e antioxidante. Finalmente, observamos que esta quinurenina não provocou nenhuma alteração na morfologia das células C6 em todos os tempos de exposição testados (1-48 horas).

Tomados os resultados em seu conjunto, o presente trabalho demonstrou um efeito antioxidante da 3HKyn e do 3HAA em homogeneizado de córtex cerebral de ratos de 30 dias de idade e em homogeneizado de células C6 cultivadas, evidenciado pela diminuição da peroxidação lipídica do tecido, bem como pelo seqüestro eficiente de radicais peroxila, sendo que a 3HKyn também apresentou a mesma propriedade para radicais hidroxila. Nossos achados estão de acordo com Christen et al. (1990), que descreveram que os metabólitos derivados do triptofano com estrutura *orto*-aminofenólica possuíam efeito antioxidante contra radicais peroxila. Estudos anteriores também demonstraram

que a ativação da rota das quinureninas através do interferon γ em células mononucleares periféricas e macrófagos derivados de monócitos preveniu a peroxidação lipídica das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) causada pelo radical α -tocoferil proveniente da oxidação do α -tocoferol, principal antioxidante endógeno das LDL. Além disso, foi verificado que o metabólito da via das quinureninas responsável por essa proteção foi o 3HAA, o qual tem a capacidade de regenerar o α -tocoferol a partir de seu radical oxidante α -tocoferil, sendo, portanto um co-antioxidante das LDL (THOMAS et al., 1996).

Resumindo, demonstramos uma atividade antioxidante da 3HKyn e do 3HAA, a qual não foi verificada para seus análogos não-fenólicos Kyn e AA, respectivamente. Tendo em vista estudos anteriores, é possível que nas condições de nossos experimentos, o grupamento fenólico seja essencial para as propriedades antioxidantes desses metabólitos. Entretanto, não podemos descartar a geração de espécies reativas a partir desses metabólitos em outras condições experimentais, tais como exposição de tecidos e/ou células por períodos longos como culturas.

No que se refere ao ácido quinolínico (QA), dados da literatura têm proposto o estresse oxidativo como um dos mecanismos neurotóxicos desta quinurenina, através da estimulação de receptores NMDA e secundariamente à formação de radicais livres característicos da excitotoxicidade. Dessa forma, também testamos o efeito *in vitro* do QA sobre parâmetros de estresse oxidativo em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens para se determinar se há um efeito deste metabólito independente da estimulação prévia de receptores NMDA. Inicialmente, constatamos que o QA aumentou os valores de TBA-RS. Similarmente, diversos estudos *in vivo* e também *in vitro* já haviam demonstrado um aumento das TBA-RS em estriado de ratos e sua prevenção com o uso de agentes antioxidantes como a melatonina e o ebselênio (derivado orgânico do selênio) (CABRERA et al., 2000; ROSSATO et al., 2002; SANTAMARÍA e RÍOS, 1993; SANTAMARÍA et al., 2003; PÉREZ-SEVERIANO et al., 1998; RÍOS e SANTAMARÍA, 1991). Outros estudos verificaram que o efeito estimulatório *in vitro* do QA sobre as TBA-RS em cérebro de ratos é dependente da suplementação do

meio com ferro na forma de íon ferroso (Fe II) e ácido ascórbico (ASC), sugerindo que esse aumento da peroxidação lipídica seja devido a radicais hidroxila gerados através da reação de Fenton. Nossos resultados mostraram que o QA aumentou significativamente os valores de TBA-RS na presença ou ausência da suplementação Fe II e ASC. Essas diferenças entre nossos resultados e de outros investigadores podem ser devidas à presença de íon ferroso endógeno em nosso meio de incubação. O tecido utilizado e a idade dos animais podem também ser fatores responsáveis pelas diferenças observadas. O presente trabalho foi realizado em homogeneizado de córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida, enquanto o estudo de Stípek et al. (1997), que demonstrou a dependência por ferro do efeito estimulatório do QA sobre a peroxidação lipídica, utilizou homogeneizado de telencéfalo de ratos de 50 dias de idade. Outra possibilidade é a pureza da água e dos reagentes utilizados em cada estudo, já que o ferro pode ser um contaminante presente em vidrarias e em certos reagentes, o que também alteraria sua quantidade no meio de incubação (SCHAICH, 1990). A seguir, foi estudado o efeito do QA sobre a quimiluminescência, outro parâmetro de peroxidação lipídica, na ausência ou presença de Fe II e ASC. O QA, na concentração de 500 μ M, aumentou significativamente a quimiluminescência nas duas condições experimentais e, distintamente do que ocorreu nos experimentos de medida de TBA-RS, os experimentos na ausência do Fe II e ASC apresentaram uma quimiluminescência menor do que aqueles com Fe II e ASC. Esses resultados indicam que a adição de Fe II e ASC aumentam a produção de lipídios peroxidados que puderam ser detectados na quimiluminescência, mas não na medida das TBA-RS.

A seguir, testamos o efeito do QA sobre as defesas antioxidantes não-enzimáticas, representadas pela medida das concentrações de GSH, potencial antioxidante total (TRAP) e a reatividade antioxidante total (TAR), em córtex cerebral de ratos jovens. Observamos inicialmente que o QA somente diminuiu significativamente os níveis de GSH na presença de Fe II e ASC, sugerindo que esse efeito seja dependente da formação de radicais hidroxila oriundos da reação de Fenton. Nesse particular, estudos *in vivo* já haviam verificado uma diminuição

dos níveis de GSH e um aumento dos níveis de glutathiona oxidada (GSSG) causados pela injeção intraestriatal de 240 nmol de QA (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2000). Nossos resultados também mostraram uma significativa diminuição do TRAP e da TAR causada por esse ácido, o que indica que este metabólito diminui as defesas antioxidantes não-enzimáticas quantitativamente e qualitativamente. Tendo em vista que o estresse oxidativo ocorre quando há um aumento de radicais livres e/ou diminuição das defesas antioxidantes, a presente investigação sugere que o QA induz estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens. Nesse contexto, a maior parte dos dados da literatura sugerem que o estresse oxidativo é um mecanismo fisiopatogênico secundário à excitotoxicidade causada pelo QA. Nossos resultados sugerem que o estresse oxidativo foi causado independente da excitotoxicidade, já que utilizamos homogeneizados que foram separados dos restos celulares que continham as membranas plasmáticas onde estão os receptores glutamatérgicos. Em consonância com esses resultados, há outras evidências de que o dano neurológico produzido pelo QA pode ser devido ao aumento na produção de espécies reativas independente de sua ação nos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (PERKINS e STONE, 1983; FOSTER e SCWARCZ, 1989; WINN et al., 1991; GIUSTI et al., 1995; CAZEVIEILLE et al., 1997; BEHAN et al., 1999; STONE et al., 2000). Dessa forma, a neurodegeneração causada pelo QA pode ser também dependente da geração de espécies reativas, dentre outros mecanismos que não envolvam os receptores NMDA.

Recentemente foi proposto que os intermediários da rota das quinureninas poderiam ter um papel fundamental na lesão cerebral que ocorre em pacientes com acidemia glutárica tipo I (AG I) principalmente durante os episódios de descompensação metabólica que ocorrem após infecções (HEYES et al., 1987; VARADKAR e SURTEES, 2004). Nesse particular, está bem determinado que durante processos inflamatórios a rota das quinureninas está ativada (MOFFETT et al., 2003).

Assim, também testamos o efeito da 3HKyn sobre os valores de TBA-RS e a oxidação do DCFH-DA na presença do ácido glutárico (GA), principal

neurotoxina acumulada nessa doença. Os resultados demonstraram que o aumento na peroxidação lipídica e na produção de espécies reativas causado pelo GA foi totalmente prevenido pela 3HKyn. A seguir verificamos o efeito da co-incubação de 3HKyn, GA e ácido 3-hidroxi-glutárico (HGA), outra importante neurotoxina acumulada na AGI e que reconhecidamente induz estresse oxidativo em cérebro de ratos (LATINI et al., 2002, 2005; KÖLKER et al., 2001), sobre os valores de TBA-RS. Verificamos que houve um efeito aditivo do GA e do HGA sobre a estimulação de peroxidação lipídica, que também foi prevenido pela 3HKyn. É possível, portanto, que a produção excessiva de 3HKyn em certas situações patogênicas tenha por objetivo a compensação das ações neurotóxicas causadas por outros metabólitos acumulados.

Finalmente, também testamos o efeito da 3HKyn sobre os valores de TBA-RS na presença de QA e também na presença de QA, GA e HGA. Pôde-se constatar que o aumento nas TBA-RS causado pelo QA e pela combinação de QA, GA e HGA foram prevenidos pela 3HKyn, reforçando a hipótese de que a produção de substâncias antioxidantes através da rota das quinureninas tenha por objetivo contrabalançar o efeitos pró-oxidantes causados por diferentes metabólitos acumulados na AGI.

Concluindo, nossos resultados demonstram que determinados metabólitos da via das quinureninas, a 3HKyn e o 3HAA, possuem ação antioxidante, enquanto que o QA possui um efeito pró-oxidante. Embora não sejam conhecidas com precisão as concentrações dos vários metabólitos da via das quinureninas acumulados no cérebro de pacientes com doenças neurodegenerativas, é possível que ações antioxidantes e pró-oxidantes desses metabólitos sejam compensadas, ao menos *in vitro*, como foi demonstrado. Nesse particular, é provável ocorra o aumento dessas quinureninas durante processos infecciosos/inflamatórios, onde há liberação da citocina pró-inflamatória interferon- γ e conseqüente estimulação da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase, marcapasso metabólico da via das quinureninas (STONE et al., 1993; STONE e PERKINS, 1981; TSUZUKI et al., 1989; KIM e CHOI, 1987; SCHWARCZ et al., 1983). Assim, não podemos descartar que o acúmulo simultâneo de vários intermediários dessa rota, tais como

a 3HKyn e o 3HAA, poderia contrabalançar os efeitos tóxicos causados pelos metabólitos pró-oxidantes durante uma situação aguda, evitando, ao menos parcialmente, o dano neurológico presente nos pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHIM, C. L.; MASLIAH, E.; HEYES, M. P. Macrophage activation factors in the brains of AIDS patients. **J. Neuro-AIDS** v. 1, p. 1-16, 1996.

ALEXI, T.; BORLONGAN, C. V.; FAULL, R. L.; WILLIAMS, C. E.; CLARK, R.G.; GLUCKMAN, P. D.; HUGHES, P. E. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. **Prog. Neurobiol.** v. 60, p. 409-470, 2000.

BARAN, H.; JELLINGER, K.; DEECKE, L. Kynurenine metabolism in Alzheimer's disease. **J. Neural. Transm.** v. 106, p. 165-181, 1999.

BARAN, H.; STANIEK, K.; KEPPLINGER, B.; STUR, J.; DRAXLER, M.; NOHL, H. Kynurenines and the respiratory parameters on rat heart mitochondria. **Life Sci.** v. 72, p. 1103-1115, 2003.

BEAL, M. F.; KOWALL, N. W.; ELLISON, D.W.; MAZUREK, M.F.; SWARTZ, K. J.; MARTIN, J. B. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. **Nature** v. 321, p. 168-171, 1986.

BEAL, M. F.; KOWALL, N. W.; FERRANTE, R. J.; CIPPOLLONI, P. B. Quinolinic acid lesions in primates as a model of Huntington's disease. **Ann. Neurol.** v. 26, p. 137, 1989a.

BEAL, M. F.; KOWALL, N. W.; SWARTZ, K. J.; FERRANTE, R. J.; MARTIN, J. B. Differential sparing of somatostatin-neuropeptide Y and cholinergic neurons following striatal excitotoxin lesions. **Synapse** v. 3, p. 38-47, 1989b.

BEAL, M. F.; FERRANTE, R. J.; SWARTZ, K. J.; KOWALL, N. W. Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. **J. Neurosci.** v. 11, p. 1649–1659, 1991a.

BEAL, M. F.; SWARTZ, K. J.; FINN, S. F.; MAZUREK, M. F.; KOWALL, N. W. Neurochemical characterization of excitotoxin lesions in the cerebral cortex. **J. Neurosci.** v. 11, p. 147–158, 1991b.

BEHAN, W. M.; McDONALD, M.; DARLINGTON, L. G.; STONE, T. W. Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl. **Br. J. Pharmacol.** v. 128, p. 1754-1760, 1999.

BENDA, P.; LIGHTBODY, J.; SATO, G.; LEVINE, L.; SWEET, W. Differentiated rat glial cell strain in culture. **Science** v. 161, p. 370–371, 1968.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVA, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sci.** v. 65, p. 1865-1874, 1999.

BORDELON, Y. M.; CHESSELET, M. F.; NELSON, D.; WELSH, F.; ERECINSKA, M. Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum. **J. Neurochem.** v. 69, p. 1629-1639, 1997.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **Biochem. J.** v. 134, p. 707-716, 1973.

BROWNE, R. W. E ARMSTRONG, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. **Methods Mol. Biol.** v. 108, p. 347-352, 1998.

BURNS, L. H.; PAKZABAN, P.; DEACON, T. W.; BROWNELL, A. L.; TATTER, S. B.; JENKINS, B. G.; ISACSON, O. Selective putaminal excitotoxic

lesions in non-human primates model the movement disorder of Huntington's disease. **Neuroscience**. v. 64, p. 1007-1017, 1995.

CABRERA, J.; REITER, R. J.; TAN, D.; QI, W.; SAINZ, R. M.; MAYO, J. C.; GARCIA, J. J.; KIM, S. J.; EL-SOKKARY, G. Melatonin reduces oxidative neurotoxicity due to quinolinic acid: in vitro and in vivo findings. **Neuropharmacology** v. 39, p. 507-514, 2000.

CAZEVIEILLE, C.; SAFA, R.; OSBORNE, N. N. Melatonin protects primary cultures of rat cortical neurones from NMDA excitotoxicity and hypoxia/reoxygenation. **Brain Res**. v. 768, p. 120-124, 1997.

CERSTIAENS, A.; HUYBRECHTS, J.; KONATEN, S.; LEBEAU, I.; MEYLAERS, K.; DE LOOF, A.; SCHOOF, L. Neurotoxic and neurobehavioral effects of kynurenines in adult insects. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** v. 312, p. 1171-1177, 2003.

CHIARUGI, A.; MELI, E.; MORONI, F. Similarities and differences in the neuronal death processes activated by 3OH-kynurenine and quinolinic acid. **J. Neurochem**. v. 77, p. 1310-1318, 2001.

CHRISTEN, S.; PETERHANS, E.; STOCKER, R. Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: possible implication for inflammatory diseases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 87, p. 2506-2510, 1990.

CHRISTEN, S.; SOUTHWELL-KEELY, P. T.; STOCKER, R. Oxidation of 3-hydroxyanthranilic acid to the phenoxazinone cinnabarinic acid by peroxy radicals and by compound I of peroxidases or catalase. **Biochem**. v. 31, p. 8090-8097, 1992.

CHRISTEN, S.; THOMAS, S. R.; GARNER, B.; STOCKER, R. Inhibition by interferon- γ of human mononuclear cell-mediated low density lipoprotein oxidation. Participation of tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. **J. Clin. Invest.** v. 93, p. 2149-2158, 1994.

COLLINGRIDGE, G. L., LESTER, R. A. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. **Pharmacol. Rev.** v. 4, p. 143-210, 1989.

COOPER, N. R.; BRADT, B. M.; O'BARR, S.; YU, J. X. Focal inflammation in the brain: role in Alzheimer's disease. **Immunol. Res.** v. 21, p. 159-165, 2000.

CURZON, G. Brain tryptophan. Normal and disturbed control. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 398, p. 27-34, 1996.

DELANTY, N.; DICHTER, M. A. Oxidative injury in the nervous system. **Acta Neurol. Scand.** v. 98, p. 145-153, 1998.

DE OLIVEIRA MARQUES, F.; HAGEN, M. E. K.; PEDERZOLLI, C. D.; SGARAVATTI, A. M.; DURIGON, K.; TESTA, C. G.; WANNMACHER, C. M.; DE SOUZA WYSE, A. T.; WAJNER, M.; DUTRA-FILHO, C. S. Glutaric acid induces oxidative stress in brain of young rats. **Brain Res.** v. 964, p. 153-158, 2003.

DONG-RUYI, L.; SAWADA, M.; NAKANO, K. Tryptophan and its metabolite, kynurenine, stimulate expression of nerve growth factor in cultured mouse astroglial cells. **Neuroscience** v. 244, p. 17-20, 1998.

DYKENS, J. A.; SULLIVAN, S. G.; STERN, A. Oxidative reactivity of the tryptophan metabolites 3-hydroxyanthranilate, cinnabarinic acid, quinolinic acid and picolinic acid. **Biochem. Pharmacol.** v. 36, p. 211-217, 1987.

DYKENS, J. A.; SULLIVAN, S. G.; STERN, A. Glucose metabolism and hemoglobin reactivity in human red blood cells exposed to the tryptophan metabolites 3-hydroxyanthranilate, quinolinate and picolinate. **Biochem. Pharmacol.** v. 38, p. 1555-1562, 1989.

EASTMAN, C. L., GUILARTE, T. R. Citotoxicity of 3-hydroxykynurenine in a neuronal hybrid cell line. **Brain Res.** v. 495, p. 225-231, 1989.

ELLISON, D. W.; BEAL, M. F.; MAZUREK, M. F.; MALLOY, J. R.; BIRD, E. D.; MARTIN, J. B. Amino acid neurotransmitter abnormalities in Huntington's disease and the quinolinic acid animal model of Huntington's disease. **Brain** v. 110 p. 1657-1673, 1987.

[ESTERBAUER, H. e CHEESEMAN, K. H.](#) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Meth. Enzymol.** v. 186, p. 407-421, [1990](#).

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil.** v. 43, p. 61-68, 1997.

FOSTER, A. C.; SCHWARCZ, R. Neurotoxic effects of quinolinic acid in the mammalian central nervous system. In: STONE, T. W. (Ed.) **Quinolinic acid and the kynurenines**. CRC Press, Boca Raton, p. 173-192, 1989.

GIUSTI, P.; GUSELLA, M.; LIPARTITI, M.; MILANI, D.; ZHU, W.; VICINI, S.; MANEV, H. Melatonin protects primary cultures of cerebellar granule neurones from kainate but not from N-metil-D-aspartate excitotoxicity. **Exp. Neurol.** v. 131, p. 39-46, 1995.

GODA, K.; HAMANE, Y.; KISHIMOTO, R.; OGISHI, Y. Radical scavenging properties of tryptophan metabolites. Estimation of their radical reactivity. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 467, p. 397-402, 1999.

GOLDBERG, W. J.; LEVINE, K. V.; TADVALKAR, G.; LAWS, E. R.; BERNATEIN, J. Mechanisms of C6-glioma cell and fetal cell astrocyte migration into hydrated collagen I gels. **Brain Res.** v. 581, p. 81–90, 1992.

GOLDSTEIN, L. E.; LEOPOLD, M. C., HUANG, X.; ATWOOD, C. S.; SAUNDERS, A. J.; HARTSHORN, M.; LIM, J. T.; FAGET, K. Y.; MUFFAT, J. A.; SCARPA, R. C.; CHYLACK, L. T. JR.; BOWDEN, E. F.; TANZI, R. E.; BUSH, A. I. 3-Hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid generate hydrogen peroxide and promote α -crystallin cross-linking by metal ion reduction. **Biochemistry** v. 39, 7266-7275, 2000.

GONZÁLEZ-FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. **Free Radic. Biol. Med.** v. 10, p. 93-100, 1991.

GUILLEMIN, G.; CROITORU, J.; DORMONT, D. Involvement of quinolinic acid in chemokine production and chemokine receptor expression in astrocytes. **J. Neurovirol.** v. 6, p. 242, 2000.

GUILLEMIN, G.; CROITORU, J.; SMITH, D. G. Quinolinic acid up-regulates chemokine production and chemokine receptor expression in astrocytes: implications for brain inflammation and AIDS. **J. Neuroimmunol.** v. 118, p. 119, 2001.

GUILLEMIN, G. J.; BREW, B. Implications of the kynurenine pathway and quinolinic acid in Alzheimer's disease. **Redox Report** v. 7, p.1-8, 2002.

GU, M.; GASH, M. T.; MANN, V. M.; JAVOY-AGID, F.; COOPER, J. M.; SCHAPIRA, A. H. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. **Ann. Neurol.** v. 39, p. 385-389, 1996.

HAYASHI, O. My life with tryptophan – never a dull moment. In: Ishiguro, I. et al. (Eds.) **Advances in tryptophan research**. Toyoake: Fujita Health University Press, p. 3-16, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Formation of a thiobarbituric acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts-the role of superoxide and hydroxyl radicals. **FEBS Lett.** v. 128, p. 347-351, 1981.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed. New York: Oxford University Press Inc., 1999.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. **Drugs & Aging** v. 18, p. 685-716, 2001.

HEYES, M. P. Hypothesis: a role for quinolinic acid in the neuropathology of glutaric aciduria type I. **Can. J. Neurol. Sci.** v. 14, p. 441-443, 1987.

HEYES, M. P.; RUBINOW, D.; LANE, C.; MARKEY, S. P. Cerebrospinal fluid quinolinic acid concentrations are increased in acquired immune deficiency syndrome. **Ann. Neurol.** v. 26, p. 275-277, 1989.

HEYES, M. R.; BREW, B. J.; MARTIN, A.; PRICE R. W.; SALAZAR, A. M.; SIDTIS, J. J.; YERGEY, J. A.; MOURADIAN, M. M.; SADLER, A. E.; KEILP, J.

Quinolinic acid in cerebrospinal fluid and serum in HIV-1 infection: relationship to clinical and neurological status. **Ann. Neurol.** v. 29, p. 202-209, 1991.

HEYES, M. P.; SAITO, K.; CROWLEY, J. S.; DAVIS, L. E.; DEMITRACK, M. A.; DER, M.; DILLING, L. A.; ELIA, J.; KRUESI, M. J.; LACKNER, A. Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurologic disease. **Brain** v. 115, p. 1249–1273, 1992.

HEYES M. P.; SAITO, K.; LACKNER, A.; WILEY, C. A.; ACHIM, C. L.; MARKEY, S. P. Sources of neurotoxin quinolinic acid in the brain of HIV-1 infected patients and retrovirus-infected macaques. **FASEB J.** v. 12, p. 881-896, 1998.

HIRAKU, Y.; INOUE, S.; OIKAWA, S.; YAMAMOTO, K.; TADA, S.; NISHINO, K.; KAWANISHI, S. Metal-mediated oxidative damage to cellular and isolated DNA by certain tryptophan metabolites. **Carcinogenesis** v. 16, p. 349-356, 1995.

IZQUIERDO, I. Pharmacological evidence for a role of a long-term potentiation in memory. **Faseb J.** v. 8, p. 1139-1145, 1994.

JANETZKY, B.; HAUCK, S.; YODIM, M. B. H.; RIEDERER, P.; JELLINGER, K.; PANTUCEK, F.; ZOCHLING, R.; BOISSEL, K. W.; REICHMANN, H. Unaltered aconitase activity but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. **Neurosci. Lett.** v. 169, p. 126-128, 1994.

KIM, J. P., CHOI, D. W. Quinolinic acid neurotoxicity in cortical cell culture. **Neuroscience** v. 23, p. 423–432, 1987.

KOH, J. -Y.; PETERS, S.; CHOI, D. W. Neurones containing NADPH-diaphorase are selectively resistant to quinolinate toxicity. **Science** v. 234, p. 73–76, 1986.

KOH, J. -Y.; CHOI, D. W. Cultured striatal neurones containing NADPH-diaphorase or acetylcholinesterase are selectively resistant to injury by NMDA receptor agonists. **Brain Res.** v. 446, p. 374–378, 1988.

KÖLKER, S.; AHLEMEYER, B.; KRIEGLSTEIN, J.; HOFFMANN, G. F. Contribution of reactive oxygen species to 3-hydroxyglutarate neurotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. **Pediatr. Res.** v. 50, p. 76-82, 2001.

LAPIN, I. P. Taurine antagonizes L-kynurenine-produced seizures in mice. **J. Neural. Transm.** v. 48, p. 311-316, 1980.

LATINI, A.; BORBA ROSA, R.; SCUSSIATO, K.; LLESUY, S.; BELLO-KLEIN, A.; WAJNER, M. 3-Hydroxyglutaric acid induces oxidative stress and decreases the antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats. **Brain Res.** v. 956, p. 367-373, 2002.

LATINI, A.; SCUSSIATO, K.; LEIPNITZ, G.; DUTRA-FILHO, C. S.; WAJNER, M. Promotion of oxidative stress by 3-hydroxyglutaric acid in rat striatum. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 28, p. 57-67, 2005.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem. Res. Toxicol.** v. 5, p. 227-231, 1992.

LEE, H. J.; BACH, J. H.; CHAE, H. S.; LEE, S. H.; JOO, W. S.; CHOI, S. H.; KIM, K. Y.; LEE, W. B.; KIM, S. S. Mitogen-activated protein kinase/extracellular

signal-regulated kinase attenuates 3-hydroxykynurenine-induced neuronal cell death. **J. Neurochem.** v. 88, p. 647-656, 2004.

LISSI, E.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M. D. Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) thermolysis. **Free Rad. Res. Comm.** v. 17, p. 299-311, 1992.

LISSI, E.; SALIM-HANNA, M.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M. D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. **Free Rad. Biol. Med.** v. 18, p. 153-158, 1995.

LOVELL, M. A.; XIE, C.; MARKESBERY, W. R. Decreased base excision repair and increased helicase activity in Alzheimer's disease brain. **Brain Res.** v. 855, p. 116-123, 2000.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; LEWIS-FARR, A.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v. 193, p. 265-275, 1951.

MANGOURA, D.; SAKELLARDIS, N.; LONES, J.; VERNADAKIS, A. Early and late passage C-6 glial cell growth: Similarities with primary glial cells in culture. **Neurochem. Res.** v. 14, p. 941-947, 1989.

MARK, R. J. Common mechanisms of oxidative damage in chronic neurodegenerative conditions: potential points of therapeutic intervention. **Exp. Opin. Ther. Patents**, v. 9, p. 1339-1346, 1999.

MARKESBERY, W. R.; CARNEY, J. M. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. **Brain Pathol.** v. 9, p. 133-146, 1999.

MARTIN, A.; HEYES, M. P.; SALAZAR, A. M.; KAMPEN, D. L.; WILLIAMS, J.; LAW, W. A.; COATS, M. E.; MARKEY, S. P. Progressive slowing of reaction time and increasing cerebrospinal fluid concentrations of quinolinic acid in HIV-infected individuals. **J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.** v. 4, p. 270-279, 1992.

MAXWELL, S. R. J. Prospects for the use of antioxidant therapies. **Drugs** v. 49, p. 345-361, 1995.

MOFFETT, J. R.; NAMBOODIRI, M. A. Tryptophan and the immune response. **Immunol. Cell Biol.** v. 81, p. 247-265, 2003.

NICHOLSON, L. F. B.; FAULL, R. L. M.; WALDVOGEL, H. J.; DRAGUNOW, M. GABA and GABAA receptor changes in the substantia nigra of the rat following quinolinic acid lesions in the striatum closely resemble Huntington's disease. **Neuroscience** v. 66, p. 507-521, 1995.

NOUROOZ-ZADEH, J.; LIU, E. H.; YHLEN, B.; ANGGARD, E. E.; HALLIWELL B. F4-isoprostanes as specific marker of docosahexaenoic acid peroxidation in Alzheimer's disease. **J. Neurochem.** v. 72, p.734-740, 1999.

OGAWA, T.; MATSON, W. R.; BEAL, M. F.; MYERS, R. H.; BIRD, E. D.; MILBURY, P.; SASO, S. Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease. **Neurology** v. 42, p. 1702-1706, 1992.

OKUDA, S.; NISHIYAMA, N.; SAITO, H.; KATSUKI, H. Hydrogen peroxide-mediated neuronal cell death induced by an endogenous neurotoxin, 3-hydroxykynurenine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 93, p. 12553-12558, 1996.

OKUDA, S.; NISHIYAMA, N.; SAITO, H.; KATSUKI, H. 3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes cell death

with apoptotic features and region selectivity. **J. Neurochem.** v. 70, p. 299-307, 1998.

OLNEY, J. W. Excitotoxic mechanisms of neurotoxicity. In: Spencer P.S., Schaumburg, H.H., eds. **Clinical and Experimental Neurotoxicology**. Williams and Wilkins, Baltimore, p. 272-294, 1980.

OZAWA, S. HARUYUKI, K., TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology** v. 54, p. 581-618, 1998.

PARKER, K. P.; NOREMBERG, M. D.; VERNADAKIS, A. "Transdifferentiation" of C6-glia cells in culture. **Science** v. 208, p. 179-181, 1980.

PEARSON, S. J., REYNOLDS, G. P. Increased brain concentrations of a neurotoxin, 3-hydroxykynurenine, in Huntington's disease. **Neurosci. Lett.** v. 144, p. 199-201, 1992.

PEMBERTON, L. A.; KERR, S. J.; SMYTHE, G.; BREW, B. J. Quinolinic acid production by macrophages stimulated with IFN-gamma, TNF-alpha and IFN-alpha. **J. Interferon Cytokine Res.** v. 17, p. 589-595, 1997.

PÉREZ-SEVERIANO, F.; ESCALANTE, B. RÍOS, C. Nitric oxide inhibition prevents acute quinolinate-induced striatal neurotoxicity. **Neurochem. Res.** v. 23, p. 1297-1302, 1998.

PERKINS, M. N.; STONE, T. W. The pharmacology and regional variations of quinolinic acid induced excitation in the rat CNS. **J. Pharmacol. Exp. Therap.** v. 226, p. 551-557, 1983.

REYNOLDS, G. P.; PEARSON, S. J.; HALKET, J.; SANDLER, M. Brain quinolinic acid in Huntington's disease. **J. Neurochem.** v. 50, p. 1959–1960, 1988.

REYNOLDS, G. P., PEARSON, S. J. Increased brain 3-hydroxykynurenine in Huntington's disease. **Lancet.** v. 2, p. 979–980, 1989.

RÍOS, C.; SANTAMARÍA, A. Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. **Neurochem. Res.** v. 16, p. 1139-1143, 1991.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, E.; CAMACHO, A.; MALDONADO, P. D.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; SANTAMARÍA, D.; GALVAN-ARZATE, S.; SANTAMARÍA, A. Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. **Brain Res.** v. 858, p. 436-439, 2000.

ROSE, C. D.; HENNEBERRY, R. C. Etiology of the neurodegenerative disorders: a critical analysis. **Neurobiol. Aging.** v. 15, p. 233-234, 1994.

ROSSATO, J. I.; ZENI, G.; MELLO, G. F.; RUBIN, M. A.; ROCHA, J. B. Ebselen blocks the quinolinic acid-induced production of thiobarbituric acid reactive species but does not prevent the behavioral alterations produced by intra-striatal quinolinic acid administration in the rat. **Neuroscience Letters** v. 318, p. 137-140, 2002.

SAITO, K.; HEYES, M. P. Kynurenine pathway enzymes in brain. Properties of enzymes and regulation of quinolinic acid synthesis. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 398, p. 485-492, 1996.

SANTAMARÍA, A.; RÍOS, C. MK-801, an N-metil-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. **Neurosci. Lett.** v. 159, p. 51-54, 1993.

SANTAMARÍA, A.; FLORES-ESCArtÍN, A.; MARTÍNEZ, J. C.; OSORIO, L.; GALVAN-ARZATE, S.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; MALDONADO, P. D.; MEDINA-CAMPOS, O. N.; JIMENEZ-CAPDEVILLE, M. E.; MANJARREZ, J.; RIOS, C. Cooper blocks quinolinic acid neurotoxicity in rats: contribution of antioxidant systems. **Free Radic Biol Med**, v. 35, p. 418-427, 2003.

SCHAICH, K. M. Preparation of metal-free solutions for studies of reactive oxygen species. **Methods Enzymol.** v. 186, p. 121-125, 1990.

SCHAPIRA, A. H.; COOPER, J. M.; DEXTER, D.; JENNER, P.; CLARK, J. B.; MARSDEN, C. D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **Lancet.** v. 1, p. 1269, 1989.

SCHAPIRA, A. H.; COOPER, J. M.; DEXTER, D.; JENNER, P.; CLARK, J. B.; MARSDEN, C. D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **J. Neurochem.** v. 54, p. 823-827, 1990a.

SCHAPIRA, A. H. V.; MANN, V. M.; COOPER, J. M. DEXTER, D.; DANIEL, S. E.; JENNER, P.; CLARK, J. B.; MARSDEN, C. D. Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. **J. Neurochem.** v. 55, p. 2142-2145, 1990b.

SCHWARCZ, R.; WHETSELL, W. O., JR; MANGANO, R. M. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. **Science** v. 219, p. 316–318, 1983.

SCHWARCZ, R.; TAMMINGA, C. A.; KURLAN, R.; SHOULSON, I. CSF levels of quinolinic acid in Huntington's disease and schizophrenia. **Ann. Neurol.** 24, 580–582, 1988a.

SCHWARCZ, R.; OKUNO, E.; WHITE, R. J.; BIRD, E. D.; WHETSELL, W. O. 3-Hydroxyanthranilate oxygenase activity is increased in the brains of Huntington disease victims. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 85, p. 4079–4081, 1988b.

SHEAR, D. A.; DONG, J.; HAIK-OREGUER, K. L.; BAZZETT, T. J.; ALBIN, R. L.; DUNBAR, G. L. Chronic administration of quinolinic acid in the rat striatum causes spatial learning deficits in a radial arm water maze task. **Exp. Neurol.** v. 150, p. 305-311, 1998.

SMITH, C. D.; CARNEY, J. M.; STARKE-REED, P. E.; OLIVER, C. N.; STADTMAN, E. R.; FLOYD, R. A.; MARKESBERY, W. R. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer's disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 88, p. 10540-10543, 1991.

SOUTHORN, P. A.; POWIS, G. Free radicals in medicine I. Chemical nature and biological reactions. **Mayo Clin. Proc.** v. 63, p. 381-389, 1988.

STÍPEK, S.; STASTNY, F.; PLÁTENIK, J.; CRKOVSKÁ, J.; ZIMA, T. The effect of quinolinate on rat brain lipid peroxidation is dependent on iron. **Neurochem. Int.** v. 30, p. 233-23, 1997.

STONE, T. W., PERKINS, M. N. Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. **Eur. J. Pharmacol.** v. 72, p. 411–412, 1981.

STONE, T. W. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. **Pharmacol. Rev.** v. 45, p. 309-379, 1993.

STONE, T. W.; BEHAN, W. M. H.; MacDONALD, M.; DARLINGTON, L. G. Possible mediation of quinolinic acid-induced hippocampal damage by reactive oxygen species. **Amino Acids** v. 19, p. 275-281, 2000.

STONE, T. W. Endogenous neurotoxins from tryptophan. **Toxicon** v. 39, p. 61-73, 2001.

STOREY, E.; KOWALL, N. W.; FINN, S. F.; MAZUREK, M. F.; BEAL, M. F. The cortical lesion of Huntington's disease-further neurochemical characterization and reproduction of some of the histological and neurochemical features by NMDA lesions of rat cortex. **Ann. Neurol.** v. 32, p. 526-534, 1992.

STOREY, E.; CIPOLLONI, P. B.; FERRANTE, R. J.; KOWALL, N. W.; BEAL, M. F. Movement disorder following excitotoxin lesions in primates. **Neuroreport.** v. 5, p. 1259-1261, 1994.

SUSEL, Z.; ENGBER, T. M.; KUO, S.; CHASE, T. N. Prolonged infusion of quinolinic acid into rat striatum as an excitotoxic model of neurodegenerative disease. **Neurosci. Lett.** v. 121, p. 234-238, 1991.

THOMAS, S. R.; WITTING, P. K.; STOCKER, R. 3-Hydroxyanthranilic acid is an efficient, cell-derived co-antioxidant for α -tocopherol, inhibiting human low density lipoprotein and plasma lipid peroxidation. **J. Biol. Chem.** v. 271, p. 32714-32721, 1996.

TSUZUKI, K.; LINO, M.; OZAWA, S. Change in calcium permeability caused by quinolinic acid in cultured rat hippocampal neurons. **Neurosc. Lett.**, v. 105, p. 269-274, 1989.

VARADKAR, S.; SURTEES, R. Glutaric aciduria type I and kynurenine pathway metabolites: a modified hypothesis. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 27, p. 835-842, 2004.

WARD, R. J.; PETERS, T. J. Free Radicals. In: MARSHALL, W.J.; BANGERT, S.K. (Eds). **Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects.** New York: Churchill Livingstone, p. 765-777, 1995.

WIDNER, B.; LEBLHUBER, F.; WALLI, J.; TILZ, G. P.; DEMEL, U.; FUCHS, D. Degradation of tryptophan in neurodegenerative disorders. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 467, p. 133-138, 1999.

WIDNER, B.; LEBLHUBER, F.; WALLI, J.; TILZ, G. P.; DEMEL, U.; FUCHS, D. Tryptophan degradation and immune activation in Alzheimer's disease. **J. Neural. Trasm.** v. 107, p. 343-353, 2000.

WINN, P.; STONE, T. W.; LATIMER, M.; HASTINGS, M. H.; CLARK, A. J. A comparison of excitotoxic lesions of the basal forebrain by kainate quinolinate, ibotenate, NMDA or quisqualate and the effects on toxicity of 2-amino-5-phosphonovaleric acid and kynurenic acid in the rat. **Br. J. Pharmacol.** v. 102, p. 904-908, 1991.

ANEXO I

Resumo do artigo submetido para publicação na revista *Neurochemistry International* resultante desta dissertação.

Evidence that 3-hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid may act as antioxidants in the brain

Guilhian Leipnitz¹, Cristiana Schumacher¹, Karina B. Dalcin¹, Karina Scussiato¹, Alexandre Francisco Solano¹, Cláudia Funchal¹, Carlos S. Dutra-Filho¹, Angela T. S. Wyse¹, Clóvis M. D. Wannmacher¹, Alexandra Latini^{1,2} and Moacir Wajner^{1,2,3*}

1 – Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brasil.

2 – Hospital de Clínicas, Serviço de Genética Médica, Porto Alegre – RS, Brasil.

3 – Universidade Luterana do Brasil, Canoas – Brasil.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from FAPERGS, PRONEX II and CNPq-Brazil.

*Corresponding Author: Moacir Wajner

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos N° 2600 – Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS – Brasil. Phone: +55 51 3316-5571, fax: +55 51 3316-5535, e-mail: mwajner@ufrgs.br

Abstract

The *in vitro* effect of 3-hydroxykynurenine (3HKyn), 3-hydroxyanthranilic acid (3HAA), kynurenine (Kyn) and anthranilic acid (AA) on various parameters of oxidative stress in rat cerebral cortex and in cultured C6 glioma cells was examined. It was demonstrated that 3HKyn and 3HAA in the absence and presence of ferrous or ferric ions significantly reduced thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) and chemiluminescence measurements in rat cerebral cortex, indicating that these metabolites prevent lipid peroxidation in the brain. In addition, GSH spontaneous oxidation was significantly prevented by 3HAA, but not by the other metabolites in cerebral cortex. We also verified that 3HKyn and 3HAA significantly reduced the peroxy radicals induced by the thermolysis of 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane)-derived peroxy radicals to a higher degree than the classical peroxy scavenger Trolox. Moreover, 2-deoxy-D-ribose degradation was significantly prevented by 3HKyn implying that this metabolite was able to scavenge hydroxyl radicals. Furthermore, 3HKyn induced an increase of the total antioxidant reactivity in C6 cells cultures when exposed for 1-48 hours to this kynurenine. TBA-RS was significantly reduced in C6 cells exposed for 1 to 6 hour incubation to 3HKyn. In contrast, C6 cell morphology was not altered by 3HKyn. Finally, we tested whether 3HKyn could prevent the increased free radicals production induced by glutaric acid (GA), the major metabolite accumulating in the neurometabolic disorder glutaric acidemia type I, by investigating the isolated and combined effects of these compounds on TBA-RS levels and 2',7'-dihydrodichlorofluorescein (DCFH) oxidation in rat brain. GA provoked a significant increase of TBA-RS values and of DCFH oxidation, effects which were attenuated and fully prevented, respectively, by 3HKyn. The results strongly indicate that 3HKyn and 3HAA behave as antioxidants in cerebral cortex and C6 glioma cells from rats.

ANEXO II

Resumo do artigo publicado na revista International Journal of Developmental Neuroscience resultante desta dissertação.

LISTA DE FIGURAS

Figura I. 1 Rota de degradação do triptofano: via das quinureninas.....	6
Figura IV. 1 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	30
Figura IV. 2 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de 25 µM de íon ferroso (Fe II) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	31
Figura IV. 3 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de 25 µM de íon férrico (Fe III) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	32
Figura IV. 4 Efeito <i>in vitro</i> da quinurenina (Kyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	33
Figura IV. 5 Efeito <i>in vitro</i> da quinurenina (Kyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de 25 µM de íon ferroso (Fe II) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	34
Figura IV. 6 Efeito <i>in vitro</i> da quinurenina (Kyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de 25 µM de íon férrico (Fe III) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	35
Figura IV. 7 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HAA) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens.....	37
Figura IV. 8 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HAA) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de 25 µM de íon ferroso (Fe II) em homogeneizado	

de córtex cerebral de ratos jovens.....	38
Figura IV. 9 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HAA) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de 25 µM de íon férrico (Fe III) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	39
Figura IV. 10 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico (AA) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens.....	40
Figura IV. 11 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico (AA) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de 25 µM de íon ferroso (Fe II) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	41
Figura IV. 12 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico (AA) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de 25 µM de íon férrico (Fe III) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	42
Figura IV. 13 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (QA) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	44
Figura IV. 14 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (QA) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de 2 µM de íon ferroso (Fe II) e 250 µM de ácido ascórbico (ASC) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	45
Figura IV. 15 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxi-quinurenina (3HKyn) sobre a quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	46
Figura IV. 16 Efeito <i>in vitro</i> da quinurenina (Kyn) sobre a quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	47
Figura IV. 17 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HAA) sobre a quimiluminescência em homogeneizado de	

córtex cerebral de ratos jovens.....	48
Figura IV. 18 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico (AA) sobre a quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	49
Figura IV. 19 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (QA) sobre a quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	51
Figura IV. 20 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (QA) sobre a quimiluminescência na presença de 2 µM de íon ferroso (Fe II) e 250 µM de ácido ascórbico (ASC) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	52
Figura IV. 21 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as concentrações de glutathiona (GSH) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	53
Figura IV. 22 Efeito <i>in vitro</i> da quinurenina (Kyn) sobre as concentrações de glutathiona (GSH) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	54
Figura IV. 23 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HAA) sobre as concentrações de glutathiona (GSH) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	55
Figura IV. 24 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico (AA) sobre as concentrações de glutathiona (GSH) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	56
Figura IV. 25 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (QA) sobre as concentrações de glutathiona (GSH) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	58
Figura IV. 26 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (QA) sobre as concentrações de glutathiona (GSH) na presença de 2 µM de íon ferroso (Fe II) e 250 µM de ácido ascórbico (ASC) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	59
Figura IV. 27 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre a	

oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	61
Figura IV. 28 Efeito <i>in vitro</i> da quinurenina (Kyn) sobre a oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	62
Figura IV. 29 Efeito da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre a oxidação da 2-deoxi-D-ribose.....	64
Figura IV. 30 Efeito da quinurenina (Kyn) sobre a oxidação da 2-deoxi-D-ribose.....	65
Figura IV. 31 Efeito do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HAA) sobre a oxidação da 2-deoxi-D-ribose.....	66
Figura IV. 32 Efeito do ácido antranílico (AA) sobre a oxidação da 2-deoxi-D-ribose.....	67
Figura IV. 33 Efeito da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre os radicais peroxila derivados do 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP).....	69
Figura IV. 34 Efeito do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HAA) sobre os radicais peroxila derivados do 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP).....	70
Figura IV. 35 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (QA) sobre o potencial antioxidante total (TRAP) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	71
Figura IV. 36 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (QA) sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	72
Figura IV. 37 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre a oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) na presença de ácido glutárico (GA) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	74
Figura IV. 38 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de ácido glutárico (GA) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	75

Figura IV. 39 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de ácido glutárico (GA) e ácido 3-hidroxi glutárico (HGA) ou na presença de ácido quinolínico (QA) quando co-incubado com GA e HGA em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	77
Figura IV. 40 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) na presença de ácido quinolínico (QA) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	78
Figura IV. 41 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de células C6 cultivadas em diferentes tempos de exposição (1-48 horas).....	80
Figura IV. 42 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em homogeneizado de células C6 cultivadas em diferentes tempos de exposição (1-48 horas).....	81
Figura IV. 43 Efeito da 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) sobre a morfologia de células C6 cultivadas com um tempo de exposição de 48 horas.....	82