

**EFEITO *IN VITRO* DE QUINURENINAS SOBRE PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS DO METABOLISMO ENERGÉTICO EM CÉREBRO DE
RATOS JOVENS**

PATRÍCIA FERNANDA SCHUCK

ORIENTADOR: Prof. Dr. MOACIR WAJNER

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCOS LUIS SANTOS PERRY

**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, 2005

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul por me proporcionar uma formação gratuita e de altíssima qualidade.

A todos os colegas do Grupo de Erros Inatos do Metabolismo por toda a ajuda e carinho.

Aos professores Angela Wyse e Carlos Severo Dutra-Filho por todos os ensinamentos e “bons fluidos”.

Ao Professor Clóvis, meu avozinho querido, por toda a poesia que coloca em nossas vidas e por todo carinho.

Ao Professor Marcos Perry, meu querido co-desorientador, e seu grupo, pela acolhida, pelo carinho, pelos ensinamentos bioquímicos, literários e históricos e por tentar me mostrar que “a vida não é apenas bioquímica”.

À Andréa por todas “as figurinhas trocadas” durante a realização deste trabalho.

Às minhas amigas Cuca, Carolzinha e Ângela Sgaravatti pela amizade, carinho e pelos vários “Mc gordas”.

Aos meus eternos e maravilhosos amigos Alice, Angela Sitta, Eduardo, Jaqueline e Melissa, por estarem sempre ao meu lado.

À minha parceira de todas as “roubadas” Marina, por toda ajuda e amizade.

Às bolsistas de iniciação científica Anna Laura, Carol, Cris, Juliana e Vanessa pela amizade e por toda a ajuda.

Aos colegas de pós-graduação Guilhian, Karina Dalcin e Vilson pelo companheirismo.

Ao Dênis por toda ajuda e amizade.

À Letícia, minha primeira amiga na bioquímica, por toda amizade e carinho e por sempre estar ao meu lado.

À Karina Scussiato por toda amizade e por todos os abraços.

Ao meu grande amigo César, companheiro desde o início da faculdade, por toda ajuda dentro e fora do laboratório, por todas as conversas na janela e, principalmente, por me agüentar há tanto tempo.

À Rita, por toda ajuda, carinho e conselhos, e por iluminar a minha vida com seu sorriso.

Ao Rafael, meu maninho querido, por toda ajuda, carinho, conselhos, amizade, e por ser meu grande exemplo de pessoa.

À Alexandra Latini, minha “mamita”, por toda dedicação, carinho, amizade, ajuda e por ser meu exemplo de determinação e competência.

Ao Gustavo, meu grande e incansável amigo, por toda amizade, pela imensa ajuda, imprescindível para a realização deste trabalho, e pela ótima companhia nos sábados, domingos e feriados que passamos em frente ao espectrofotômetro.

À minha querida e incansável escravinha Anelise, por toda dedicação, paciência, carinho e amizade e pela ajuda fundamental na realização deste trabalho.

Ao meu querido “pai” e orientador Professor Moacir Wajner, por tudo o que faz por todos nós todos os dias, pelo carinho e dedicação aos seus alunos, pelo incentivo, por acreditar em mim e pela paciência durante a parte final deste trabalho.

Aos meus pais e ao meu irmão, as pessoas mais importantes da minha vida, que compreenderam minha ausência, não mediram esforços para que eu chegasse até aqui e me ensinaram a amar e a lutar incansavelmente.

A Deus, que está sempre ao meu lado, guiando meus passos, proporcionando-me tantas oportunidades e colocando em meu caminho tantas pessoas maravilhosas.

“Não é a inteligência nem a ciência que salvam o homem: é o amor”.

(Charmot)

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 o pouco conhecimento a respeito do efeito das quinureninas sobre o metabolismo energético cerebral, e considerando que as concentrações de algumas quinureninas estão alteradas em várias doenças neurodegenerativas e que disfunção mitocondrial é uma importante característica dessas doenças, este trabalho teve por objetivo investigar os efeitos *in vitro* de alguns metabólitos da via das quinureninas, particularmente L-quinurenina, ácido quinurênico, 3-hidroxiquinurenina, ácido 3-hidroxi-antranílico, ácido antranílico e ácido quinolínico sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.

Verificamos que todas as quinureninas testadas, à exceção da L-quinurenina, aumentaram a captação de glicose e inibiram a produção de CO₂ a partir de glicose, acetato e citrato em córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida. Além disso, o ácido quinurênico inibiu a atividade da enzima succinato desidrogenase, a 3-hidroxiquinurenina inibiu a atividade dos complexos I, II e IV da cadeia respiratória, enquanto que o ácido 3-hidroxi-antranílico inibiu as atividades dos complexos I e II da cadeia respiratória e da enzima succinato desidrogenase. Já o ácido antranílico inibiu as atividades do complexo I-III da cadeia respiratória e da enzima succinato desidrogenase. Por outro lado, o ácido quinolínico inibiu apenas a atividade do

complexo II, sem alterar as atividades dos outros complexos da cadeia transportadora de elétrons. Finalmente, observamos que nenhuma das substâncias testadas interferiu na atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase. Esses resultados sugerem um bloqueio no ciclo do ácido cítrico, o qual poderia ser provocado pela inibição da cadeia respiratória ocasionada pelos metabólitos testados.

Portanto nossos resultados sugerem que o metabolismo energético cerebral é inibido *in vitro* por algumas quinureninas. Caso esses achados se confirmem *in vivo*, é possível que um prejuízo no metabolismo energético possa colaborar, ao menos em parte, para o comprometimento cerebral dos pacientes afetados por doenças em que há alteração nas concentrações desses compostos.

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 the little knowledge on the role of kynurenine on cerebral energy metabolism, that the concentrations of some kynurenines are altered in neurodegenerative disorders in which mitochondrial dysfunction occurs, in the present study we investigated the *in vitro* effect of some kynurenines, namely L-kynurenine, kynurenic acid, 3-hydroxykynurenine, 3-hydroxyanthranilic acid, anthranilic acid and quinolinic acid on some important parameters of energy metabolism in cerebral cortex of young rats.

We verified that all the kynurenines tested, except L-kynurenine increased glucose uptake and inhibited CO₂ production when glucose, acetate and citrate in cerebral cortex of 30-day-old rats. Moreover, kynurenic acid inhibited succinate dehydrogenase activity. 3-hydroxykynurenine inhibited the respiratory chain complexes I, II and IV activities, while 3-hydroxyanthranilic acid inhibited the respiratory chain complexes I and II and succinate dehydrogenase activities. Anthranilic acid inhibited the respiratory chain complex I-III and succinate dehydrogenase activities. On the other hand, quinolinic acid only inhibited the respiratory chain complex II activity. Finally, we observed that the kynurenines did not modify the activity of the Na⁺,K⁺-ATPase. These results indicate a blockage in the Krebs cycle which could be provoked by the respiratory chain inhibition caused by these metabolites.

Taken together, these *in vitro* results suggest that the brain energy metabolism may be impaired by some of the kynurenines. In case the effects detected in this

study also occur *in vivo*, it is tempting to speculate that they may contribute, at least in part, to the neurological dysfunction found in disorders in which the concentrations of kynurenines are altered.

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1 Rota de degradação do triptofano: via das quinureninas.	30
Figura I.2 Fluxo de elétrons através dos quatro complexos da cadeia respiratória...	43
Figura I.3 Transporte transmembrana de íons realizado pela enzima Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.	46
Figura IV.1. Efeito <i>in vitro</i> da L-quinurenina (QUI) sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.	64
Figura IV.2 Efeito <i>in vitro</i> da L-quinurenina (QUI) sobre a produção de CO ₂ a partir de glicose em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	65
Figura IV.3 Efeito <i>in vitro</i> da L-quinurenina (QUI) sobre a produção de CO ₂ a partir de acetato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	66
Figura IV.4 Efeito <i>in vitro</i> da L-quinurenina (QUI) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.	69
Figura IV.5 Efeito <i>in vitro</i> da L-quinurenina (QUI) sobre a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	70
Figura IV.6 Efeito <i>in vitro</i> da L-quinurenina (QUI) sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens. ...	71
Figura IV.7 Efeito <i>in vitro</i> da L-quinurenina (QUI) sobre a atividade do complexo II-III da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	72
Figura IV.8. Efeito <i>in vitro</i> da L-quinurenina (QUI) sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens...	73
Figura IV.9 Efeito <i>in vitro</i> da L-quinurenina (QUI) sobre a atividade da SDH em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	74

Figura IV.10 Efeito <i>in vitro</i> da L-quinurenina (QUI) sobre a atividade da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.....	76
Figura IV.11 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinurênico (AK) sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.....	78
Figura IV.12 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinurênico (AK) sobre a produção de CO ₂ a partir de glicose em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	79
Figura IV. 13 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinurênico (AK) sobre a produção de CO ₂ a partir de acetato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	80
Figura IV.14 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinurênico (AK) sobre a produção de CO ₂ a partir de citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	81
Figura IV.15 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinurênico (AK) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.....	83
Figura IV.16 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinurênico (AK) sobre a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	84
Figura IV.17 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinurênico (AK) sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	85
Figura IV.18 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinurênico (AK) sobre a atividade do complexo II-III da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	86
Figura IV.19 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinurênico (AK) sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	87

Figura IV.20 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinurênico (AK) sobre a atividade da SDH em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	88
Figura IV.21 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinurênico (AK) sobre a atividade da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.	90
Figura IV.22 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HQ) sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.	92
Figura IV.23 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HQ) sobre a produção de CO ₂ a partir de glicose em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	93
Figura IV.24 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HQ) sobre a produção de CO ₂ a partir de acetato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	94
Figura IV.25 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HQ) sobre a produção de CO ₂ a partir de citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	95
Figura IV.26 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HQ) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.	97
Figura IV.27 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HQ) sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	98
Figura IV.28 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HQ) sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	99
Figura IV.29 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HQ) sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	100

Figura IV.30 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HQ) sobre a atividade da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.....	102
Figura IV.31 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.....	104
Figura IV.32 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a produção de CO ₂ a partir de glicose em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	105
Figura IV.33 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a produção de CO ₂ a partir de acetato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	106
Figura IV.34 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a produção de CO ₂ a partir de citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	107
Figura IV.35 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.....	109
Figura IV.36 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	110
Figura IV.37 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	111
Figura IV.38 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	112

Figura IV.39 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a atividade da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.....	114
Figura IV.40 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico (AA) sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.....	116
Figura IV.41 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico (AA) sobre a produção de CO ₂ a partir de glicose em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	117
Figura IV.42 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico (AA) sobre a produção de CO ₂ a partir de acetato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	118
Figura IV.43 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico (AA) sobre a produção de CO ₂ a partir de citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	119
Figura IV.44 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico (AA) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.....	121
Figura IV.45 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico (AA) sobre a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	122
Figura IV.46 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico (AA) sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	123
Figura IV.47 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico (AA) sobre a atividade do complexo II-III da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	124
Figura IV.48 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico (AA) sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	125

Figura IV.49 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico (AA) sobre a atividade da SDH em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	126
Figura IV.50 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico (AA) sobre a atividade da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.	128
Figura IV.51 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (AQ) sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.	130
Figura IV.52 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (AQ) sobre a produção de CO ₂ a partir de glicose em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	131
Figura IV.53 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (AQ) sobre a produção de CO ₂ a partir de acetato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	132
Figura IV.54 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (AQ) sobre a produção de CO ₂ a partir de citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	133
Figura IV.55 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (AQ) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.	135
Figura IV.56 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (AQ) sobre a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	136
Figura IV.57 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (AQ) sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	137
Figura IV.58 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (AQ) sobre a atividade do complexo II-III da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	138

Figura IV.59 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (AQ) sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	139
Figura IV.60 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (AQ) sobre a atividade da SDH em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	140
Figura IV.61 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (AQ) sobre a atividade da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.....	142

LISTA DE ABREVIATURAS

- 3HA - ácido 3-hidroxi-antranílico
- 3HQ - 3-hidroxiquinurenina
- AA - ácido antranílico
- ADP - adenosina-5'-difosfato
- AIDS - síndrome da imunodeficiência adquirida
- AK - ácido quinurênico
- AMPA - 2-hidroxi-5-metil-isoxasolpropionato
- ANOVA - análise de variância de uma via
- APP - proteína precursora de β -amilóide
- AQ - ácido quinolínico
- AQFT - ácido quinolínico fosforribosiltransferase
- ATP - adenosina-5'-trifosfato
- CoA - coenzima A
- COX - citocromo *c* oxidase
- DCIP - 2,6-dicloroindofenol
- DNA - ácido desoxirribonucleico
- EDTA - ácido etileno-diamino-tetra-acético
- EGTA - ácido etilenoglicol-bis(2-amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetra-acético
- FAD - flavina adenina dinucleotídeo oxidado
- FADH₂ - flavina adenina dinucleotídeo reduzido
- GABA - ácido gama-aminobutírico
- HEPES - ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etano sulfônico
- MOPS - ácido 3-[N-morfolino]propano-sulfônico

- NAD^+ - adenina dinucleotídeo oxidado
- NADH nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
- NGF - fator de crescimento nervoso (nerve growth factor)
- NMDA - N-metil-D-aspartato
- Pi - fosfato inorgânico
- PMS - metassulfato de fenazina
- POPOP - 1,4-bis[2-(5-fenil-oxazolil)]benzeno
- PPO - 2-difenil-oxazol
- QUI - L-Quinurenina
- SDH - succinato desidrogenase
- SNC - sistema nervoso central
- SPSS - Statistical Package for the Social Sciences
- TCA - ácido tricloroacético

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO	26
I. 1 Metabolismo do triptofano: via das quinureninas.....	26
I. 2 Atividades biológicas dos intermediários da via das quinureninas	31
I. 2.1 Quinureninas e doenças neurodegenerativas	34
I. 3 Metabolismo energético nas doenças neurodegenerativas.....	36
I. 4 Metabolismo intermediário no cérebro de mamíferos	39
I.5 Fosforilação oxidativa.....	41
I. 6 Na⁺,K⁺-ATPase	44
II OBJETIVOS.....	47
II. 1 Objetivos específicos.....	47
III MATERIAL E MÉTODOS	48
III. 1 Reagentes	48
III. 1. 1 Reagentes utilizados.....	48
III. 2 Equipamentos e outros materiais	51
III. 3 Animais	52
III. 4 Captação de glicose por fatias de córtex cerebral de ratos jovens.....	52
III.4.1 Preparação do tecido	52
III.4.2 Captação de glicose.....	53
III. 5 Produção de CO₂ por homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens	53
III. 5.1 Preparação do tecido	54
III. 5. 2 Captação de CO₂	54
III. 6 Determinação da atividade dos complexos da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos jovens	55

III. 6.1 Determinação da atividade do complexo I da cadeia respiratória (NADH desidrogenase) em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens	55
III. 6. 1. 1 Preparação mitocondrial	55
III. 6. 1. 2 Determinação da quantidade de proteína	56
III. 6. 1. 3 Determinação da atividade do complexo I da cadeia respiratória	56
III. 6. 2 Determinação das atividades dos complexos I-III, II, II-III e IV da cadeia respiratória e da enzima succinato desidrogenase em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens	57
III. 6. 2. 1 Preparação do tecido	57
III. 6. 2. 2 Determinação da quantidade de proteína	58
III. 6. 2. 3 Determinação da atividade do complexo I-III (NADH: citocromo c oxirredutase).....	58
III. 6. 2. 4 Determinação da atividade do complexo II (succinato: DCIP oxirredutase) e succinato desidrogenase (SDH).....	58
III. 6. 2. 5 Determinação da atividade do complexo II-III (succinato: citocromo c oxirredutase).....	59
III. 6. 2. 6 Determinação da atividade do complexo IV (citocromo c oxidase)....	59
III. 7 Determinação da atividade da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.....	60
III. 7. 1 Preparação de membranas plasmáticas sinápticas.....	60
III. 7. 2 Determinação da quantidade de proteína	61
III. 7. 3 Determinação da atividade enzimática.....	61
III. 8 Análise estatística	62
IV RESULTADOS	63
IV. 1 Efeito <i>in vitro</i> da L-quinurenina sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.	63

IV. 1. 1 Efeito <i>in vitro</i> da L-quinurenina (QUI) sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.....	63
IV.1. 2 Efeito <i>in vitro</i> da L-quinurenina (QUI) sobre a produção de CO ₂ a partir de glicose e acetato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	63
IV. 1. 3 Efeito <i>in vitro</i> da L-quinurenina sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos jovens.	67
IV. 1. 3. 1 Efeito <i>in vitro</i> da L-quinurenina (QUI) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.....	67
IV. 1. 3. 2 Efeito <i>in vitro</i> da L-quinurenina (QUI) sobre as atividades dos complexos I-III, II, II-III e IV da cadeia respiratória e da enzima succinato desidrogenase em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	67
IV. 1. 4 Efeito <i>in vitro</i> da L-quinurenina (QUI) sobre a atividade da enzima Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.	75
IV. 2 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinurênico sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.	77
IV. 2. 1 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinurênico (AK) sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.....	77
IV. 2. 2 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinurênico (AK) sobre a produção de CO ₂ a partir de glicose, acetato e citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	77
IV. 2. 3 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinurênico sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos jovens.	82

IV. 2. 3. 1 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinurênico (AK) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.	82
IV. 2. 3. 2 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinurênico (AK) sobre as atividades dos complexos I-III, II, II-III e IV da cadeia respiratória e da enzima succinato desidrogenase em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	82
IV. 2. 4 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinurênico (AK) sobre a atividade da enzima Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.	89
IV. 3 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.	91
IV. 3. 1 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HQ) sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.	91
IV. 3. 2 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HQ) sobre a produção de CO ₂ a partir de glicose, acetato e citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	91
IV. 3. 3 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos jovens.	96
IV. 3. 3. 1 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HQ) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.	96
IV. 3. 3. 2 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HQ) sobre as atividades dos complexos II e IV da cadeia respiratória e da enzima succinato desidrogenase em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	96

IV. 3. 4 Efeito <i>in vitro</i> da 3-hidroxiquinurenina (3HQ) sobre a atividade da enzima Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.	101
IV. 4 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 3-hidroxi-antranílico sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.	103
IV. 4. 1 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.	103
IV.4. 2 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a produção de CO ₂ a partir de glicose, acetato e citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	103
IV. 4. 3 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 3-hidroxi-antranílico sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos jovens.....	108
IV. 4. 3. 1 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.	108
IV. 4. 4 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a atividade da enzima Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.	113
IV. 5 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.	115
IV. 5. 1 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico (AA) sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.....	115
IV. 5. 2 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico (AA) sobre a produção de CO ₂ a partir de glicose, acetato e citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	115

IV. 5. 3 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos jovens.	120
IV. 5. 3. 1 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico (AA) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.	120
IV. 5. 3. 2 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico (AA) sobre as atividades dos complexos I-III, II, II-III e IV da cadeia respiratória e da enzima succinato desidrogenase em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	120
IV. 5. 4 Efeito <i>in vitro</i> do ácido antranílico (AA) sobre a atividade da enzima Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.	127
IV. 6 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.	129
IV. 6. 1 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (AQ) sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.	129
IV. 6. 2 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (AQ) sobre a produção de CO ₂ a partir de glicose, acetato e citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.	129
IV. 6. 3 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos jovens.	134
IV. 6. 3. 1 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (AQ) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.	134
IV. 6. 3. 2 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (AQ) sobre as atividades dos complexos I-III, II, II-III e IV da cadeia respiratória e da enzima succinato desidrogenase em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	134

IV. 6. 4 Efeito <i>in vitro</i> do ácido quinolínico (AQ) sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.	141
V DISCUSSÃO.....	143
VI CONCLUSÕES.....	150
VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154

I INTRODUÇÃO

I. 1 Metabolismo do triptofano: via das quinureninas

Em uma dieta normal, aproximadamente 600 a 900 mg de triptofano são ingeridos diariamente. No homem, embora parcialmente incorporado a proteínas (30% do triptofano ingerido), este aminoácido é metabolizado através de várias rotas metabólicas, originando compostos biologicamente importantes (PRICE et al., 1965; WOLF, 1974; PETERS, 1991).

Nos indivíduos hígidos, apenas pequenas quantidades de metabólitos do triptofano são excretadas pela urina diariamente. Neste particular, apenas 1 a 2% do triptofano ingerido é metabolizado a 5-hidroxi-indol-acetato através da rota da serotonina (WOLF, 1974; PETERS, 1991). Por outro lado, aproximadamente 3% do triptofano são convertidos a 3-indoxilsulfato pela ação da flora bacteriana intestinal, o qual é excretado na urina (BRYAN, 1966). O triptofano também é precursor do ácido 3-indol-acético, formado tanto por enzimas humanas quanto por enzimas bacterianas intestinais, que é normalmente excretado na urina em quantidades diárias de 100 μmol . Além disso, aproximadamente 3 a 4% do triptofano ingerido são excretados como tal na urina (WEISSBACH et al., 1959). Também foi demonstrada a participação do triptofano na biossíntese da melanina (ALLEGRI et al. 1972; DE ANTONI et al., 1974; COSTA et al., 1975).

Uma rota metabólica importante do triptofano é a via das quinureninas, a qual leva à biossíntese do ácido nicotínico (niacina), precursor de uma importante coenzima de reações biológicas, a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) (Figura I.1).

A rota das quinureninas é também a principal via metabólica na qual o triptofano é totalmente degradado via glutarato, liberando acetil-CoA para o metabolismo energético (aproximadamente 25% do fluxo desta via).

A primeira reação da via das quinureninas é catalisada pela enzima triptofano-2,3-dioxigenase (EC 1.13.11.11) no fígado e pela enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (EC 1.13.11.42) em outros tecidos, incluindo o cérebro. Essas enzimas catalisam a conversão de triptofano a N-formilquinurenina pela clivagem oxidativa do anel pirrolidínico. A N-formilquinurenina é, por sua vez, hidrolisada a L-quinurenina pela enzima quinurenina formidase. Dependendo do conteúdo e da atividade enzimática, a L-quinurenina pode ser metabolizada por três rotas distintas, podendo ser convertida a ácido quinurênico pela ação da quinurenina 2-oxoglutarato aminotransferase (EC 2.6.1.7), a 3-hidroxiquinurenina pela enzima mitocondrial quinurenina 3-hidroxilase (EC 1.14.13.9) ou a ácido antranílico pela catálise da enzima quinureninase (EC 3.7.1.3), a qual requer piridoxal-5'-fosfato como coenzima (STONE, 1993) e um 2-ceto-ácido como co-substrato, preferencialmente o piruvato. A 3-hidroxiquinurenina pode sofrer a ação da enzima quinurenina aminotransferase (a mesma que converte L-quinurenina a ácido quinurênico), formando ácido xanturênico, ou a ação da enzima quinureninase (a mesma que catalisa a conversão de quinurenina a ácido antranílico), formando ácido 3-hidroxi-antranílico. Este último é convertido a semi-aldeído 2-amino-3-carboximucônico pela enzima 3-hidroxi-antranilato 3,4-dioxigenase (EC 1.13.11.6). Este composto, por sua vez, pode se converter a ácido quinolínico pelo fechamento espontâneo do anel piridínico e que se converte a ácido nicotínico pela ação da enzima quinolinato fosforibosiltransferase (EC 2.4.2.19), sofrer a ação da enzima semi-aldeído aminocarboximuconato descarboxilase (EC 4.1.1.45) formando semi-aldeído 2-aminomucônico (que se converte espontaneamente a ácido picolínico) ou ser

oxidado enzimaticamente pela ação da aminomuconato semi-aldeído desidrogenase a ácido 2-aminomucônico, que sofre uma desaminação oxidativa, resultando em ácido 2-ceto-adípico. Este último, por sua vez, é metabolizado pela rota do glutarato, que resultará na síntese de acetil-CoA.

Segundo Allegri e colaboradores (2003), a enzima quinureninase apresenta a menor atividade enzimática dentre as enzimas da via das quinureninas, enquanto a 3-hidroxi-antranilato 3,4-dioxigenase possui a maior atividade dentre as enzimas dessa rota metabólica.

A primeira enzima da via das quinurenina, indoleamina 2,3-dioxigenase, catalisa o passo limitante dessa rota metabólica. Tal enzima é induzida por interferon γ e, em menor extensão, por interferon β , interferon α , fator de necrose tumoral e fator de agregação plaquetária, aumentando sua atividade enzimática e, conseqüentemente, o fluxo dessa rota metabólica (PEMBERTON et al., 1997; SMITH et al., 1999). Essa enzima por sua vez pode ser inibida por interleucina 4 e óxido nítrico (MUSSO et al., 1994; THOMAS et al., 1994).

Sabe-se que, quando determinados tecidos são invadidos por vírus, bactérias ou endotoxinas, há produção de interferon γ , o qual estimula a síntese de prostaglandinas, que também são indutoras da atividade da indoleamina 2,3-dioxigenase. Também foi demonstrado que, como conseqüência de um processo inflamatório, o ânion superóxido é liberado e utilizado por essa enzima, aumentando a conversão de triptofano a L-quinurenina (HAYAISHI, 1992).

No cérebro, a rota metabólica das quinureninas que leva à formação de ácido quinolínico ocorre principalmente nas células da microglia (células semelhantes a macrófagos residentes no cérebro) (HEYES et al., 1996). Em astrócitos, não há a expressão da enzima quinurenina 3-hidroxilase, o que direciona a L-quinurenina formada a partir de triptofano para a formação de ácido quinurênico. Este ácido

quinurênico produzido pelos astrócitos pode ser captado pelas células da microglia para seguir a rota das quinureninas e produzir ácido quinolínico (GUILLEMIN et al., 2001a).

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.

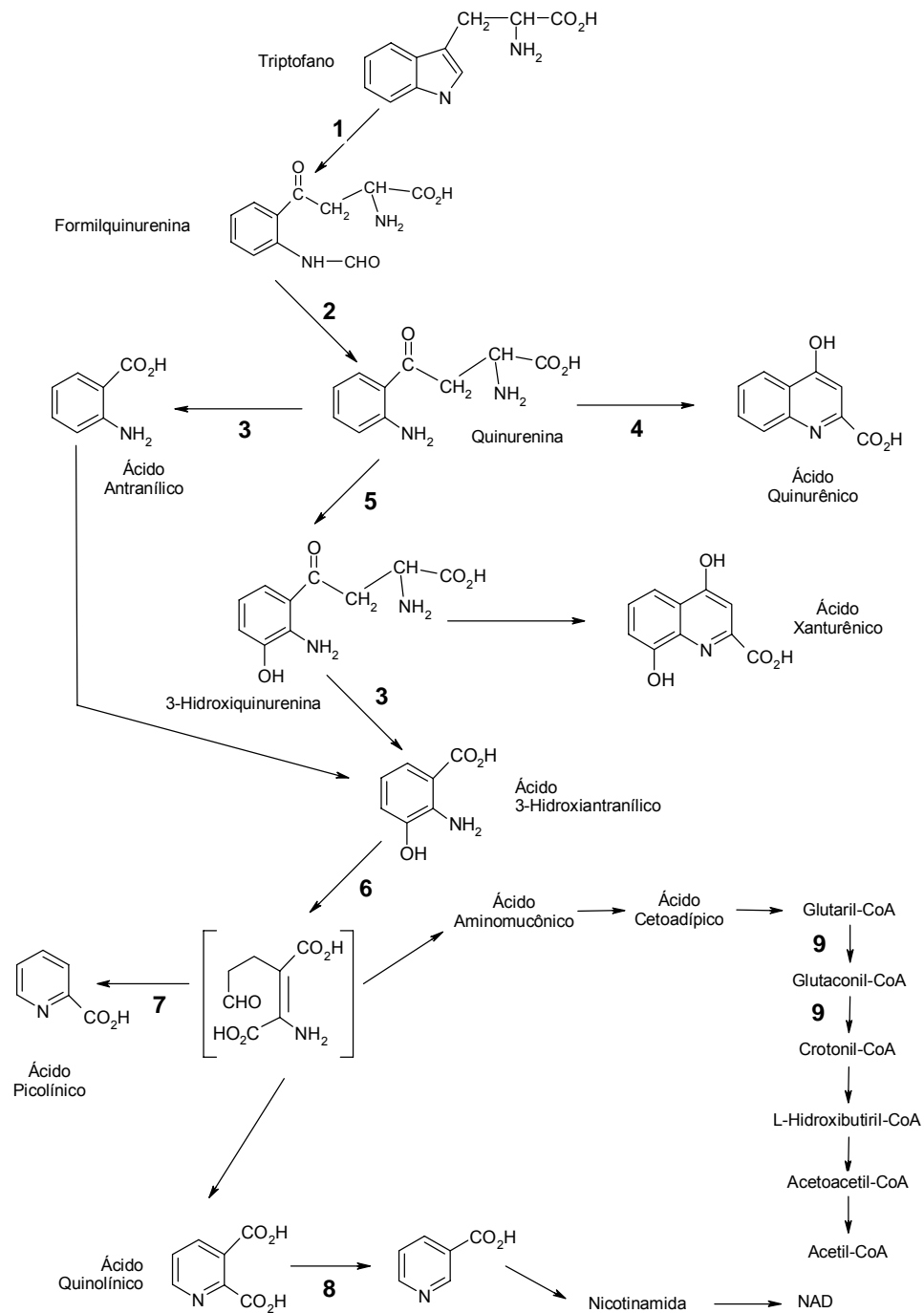


Figura I.1 Rota de degradação do triptofano: via das quinureninas. (1) Triptofano ou Indoleamina 2,3-dioxigenase; (2) Quinurenina formidase; (3) Quinureninase; (4) Quinurenina aminotransferase; (5) Quinurenina 3-hidroxilase; (6) Oxigenase do ácido 3-hidroxi-antranílico; (7) Carboxilase picolínica; (8)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

I. 2 Atividades biológicas dos intermediários da via das quinureninas

Os intermediários da via das quinureninas desempenham importante papel em algumas funções fisiológicas, tais como no comportamento, sono, termorregulação e na gestação (STONE, 1993; CURZON, 1996). Essa rota 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, 2001a), promovendo a inflamação.

Por outro lado, nos últimos anos, estes compostos têm sido relacionados à fisiopatologia de várias doenças neurodegenerativas.

Nesse particular, o ácido quinolínico (AQ) é conhecido por ser capaz de atuar seletivamente como agonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (STONE e PERKINS, 1981; SCHWARCZ et al., 1983; KIM e CHOI, 1987). Outros estudos demonstraram que o ácido quinolínico é capaz de aumentar os níveis extracelulares de glutamato, um importante aminoácido excitatório, em cérebro de ratos (MENA et al., 2000), provavelmente por inibir a captação deste aminoácido por vesículas sinápticas de cérebro de ratos (TAVARES et al., 2000). Assim, foi demonstrada a ocorrência de uma extensa lesão neuronal após injeções intra-estriatal e intra-hipocampal de ácido quinolínico (SCHWARCZ et al., 1983), e, por isso, este composto tem sido amplamente utilizado para modelo animal de doença de Huntington. Muitos estudos também têm demonstrado a formação de espécies reativas de oxigênio e lipoperoxidação induzidas por ácido quinolínico (RIOS e SANTAMARIA, 1991; BEHAN et al., 1999; SANTAMARIA et al., 2001a,b). Por outro lado, Bordelon e colaboradores (1997) demonstraram que o ácido quinolínico altera parâmetros respiratórios em ratos após injeção intra-estriatal, mas ainda pouco se conhece sobre o efeito de tal substância no metabolismo energético cerebral.

Outro composto da via das quinureninas potencialmente neurotóxico é a 3-hidroxiquinurenina (3HQ). A neurotoxicidade da 3HQ parece ser mediada por espécies reativas de oxigênio formadas como consequência da auto-oxidação de sua molécula (EASTMAN e GUILARTE, 1990; OKUDA et al., 1996; VASQUEZ et al., 2000). Nesse sentido, estudos têm demonstrado que o dano tecidual provocado por injeções *in vivo* intra-estriatais de 3HQ em ratos pode ser prevenido pela administração de antioxidantes (NAKAGAMI et al., 1996). Além disso, Stutchbury e Trustcott (1993) demonstraram que a 3-hidroxiquinurenina é capaz de reagir com proteínas modificando resíduos de lisina, e essa reação pode ser inibida pela adição de glutathione. Outros estudos *in vitro* demonstraram a ocorrência de morte celular por apoptose mediada por espécies reativas de oxigênio na presença de 3HQ (ESTMAN e GUILARTE, 1989; OKUDA et al., 1996,1998; CHIARUGI et al., 2001; LEE et al., 2004; JEONG et al., 2004). Também foi demonstrado que a 3HQ induz convulsões em camundongos após injeções intracerebroventriculares (LAPIN, 1980,1981).

Da mesma forma que a 3HQ, o ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) 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). O 3HA também possui propriedades carcinogênicas, principalmente direcionadas a câncer de mama e bexiga (BENASSI et al., 1963). Cerstiaens e colaboradores (2003) demonstraram uma toxicidade do 3HA em culturas primárias de neurônios de insetos devido ao 3HA, com indução de apoptose.

Por outro lado, foi demonstrado que o ácido quinurênico (AK), um importante intermediário da via das quinureninas, é um antagonista de vários subtipos de receptores glutamatérgicos, incluindo receptores 3-hidroxi-5-metil-isoxasolpropionato (AMPA) e kainato (PERKINS e STONE, 1982), possuindo uma alta afinidade pelo

sítio de glicina insensível à estriçnina nos receptores NMDA (BIRCH et al., 1988). O AK também é um potente antagonista não-competitivo de receptores colinérgicos do tipo $\alpha 7$ nicotínico (HILMAS et al., 2001). Além disso, têm-se demonstrado em modelos animais que o AK previne a neurotoxicidade associada a hipóxia e isquemia (FOSTER et al., 1984; GERMANO et al., 1987; GILL e WOODRUF, 1990). Foi também observado que uma inibição da enzima quinurenina 3-hidroxilase com conseqüente aumento dos níveis de ácido quinurênico produz inúmeros efeitos farmacológicos, tais como sedação, controle de convulsões, analgesia e prevenção de isquemia e dano neuronal excitotóxico (CARPENEDO et al., 1994; SPECIALE et al., 1996; WU et al., 2000). Entretanto Baran e colaboradores (2001) demonstraram que o ácido quinurênico diminui a síntese de ATP na mitocôndria, aumentando o estado IV e diminuindo a razão ADP/oxigênio a partir do consumo de glutamato/malato em mitocôndrias de coração de ratos.

A L-quinurenina (QUI), por sua vez, parece estimular a expressão do fator de crescimento nervoso (“nerve growth factor”, NGF) em células cultivadas da astroglia 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).

Embora pouco se saiba sobre a influência dos metabólitos da via das quinureninas sobre o metabolismo energético cerebral, Baran e colaboradores (2003) demonstraram que alguns dos metabólitos da via das quinureninas alteram parâmetros respiratórios em mitocôndrias de ratos. A 3-hidroxiquinurenina e o ácido 3-hidroxi-antranílico diminuíram o índice de controle respiratório e a razão ADP/oxigênio na presença de glutamato/malato e succinato, enquanto que o ácido antranílico reduziu o estado III do consumo de oxigênio.

Por outro lado, alterações nas concentrações cerebrais dos metabólitos da rota das quinureninas têm sido relacionadas a algumas doenças que afetam o sistema nervoso central, o que tem despertado muito interesse para o estudo do papel desses compostos sobre esse sistema.

I. 2.1 Quinureninas e doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas têm sido recentemente alvo de inúmeras pesquisas, visto que o número de pessoas afetadas por elas tem aumentado consideravelmente. Entretanto os mecanismos fisiopatológicos dessas doenças são pouco conhecidos. Nesse particular, tem-se estudado nos últimos anos o envolvimento dos intermediários da via das quinureninas em algumas dessas doenças, tais como nas doenças de Huntington, Alzheimer e Parkinson, na demência associada à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e na acidemia glutárica tipo I.

Várias observações levaram ao uso da administração de ácido quinolínico como modelo de doença de Huntington. Infusão crônica de ácido quinolínico 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 ácido quinolínico em macacos produzem distonia e discinesia muito semelhantes às encontradas nessa doença (STOREY et al., 1994; BURNS et al., 1995), e esses efeitos podem ser suprimidos por lesões no globo pálido (JOEL et al., 1998). A importância dessas observações é que lesões no globo pálido melhoram as alterações motoras observadas nas doenças de Huntington e Parkinson (STONE, 2001). Lesões causadas por ácido quinolínico também ocasionam depleção de neurotransmissores, tais como GABA e substância P, sem

alterações nos níveis de dopamina, de uma forma semelhante ao encontrado na doença de Huntington (BEAL et al., 1986, 1989a,b, 1991). Também foram observadas concentrações cerebrais elevadas de 3-hidroxiquinurenina e ácido quinurênico em pacientes afetados pela doença de Huntington (CONNICK et al., 1989; REYNOLDS e PEARSON, 1989; PEARSON e REYNOLDS, 1992), além de um aumento na atividade da enzima 3-hidroxiantranilato oxigenase (SCHWARCZ et al., 1988).

Os níveis de 3-hidroxiquinurenina também estão elevados no putamen e na substância nigra de pacientes com doença de Parkinson, enquanto a razão quinurenina/3-hidroxiquinurenina está reduzida na substância nigra, córtex frontal e putamen (OGAWA et al., 1992). Tal fato implica não apenas um aumento na síntese de 3-hidroxiquinurenina, que é tóxica, mas também uma menor disponibilidade de quinurenina para a síntese de ácido quinurênico. Essa combinação de efeitos pode contribuir para o dano neuronal encontrado na doença de Parkinson (STONE, 2001).

Recentemente, foi demonstrado 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 ácido quinolínico por macrófagos e, principalmente, pela microglia (GUILLEMIN et al., 2001b). Elevações nos níveis séricos de triptofano e seu metabólito L-quinurenina foram encontradas nessa doença, com o aumento desses níveis proporcional ao nível do déficit cognitivo (BARAN et al., 1999; WIDNER et al., 1999, 2000), enquanto os níveis de ácido quinurênico se encontram diminuídos (HEYES et al., 1992). Foi ainda observado que triptofano, 3-hidroxiquinurenina, ácido 3-hidroxi-antranílico e ácido quinolínico aumentam a fluidez de membrana pela diminuição da relação colesterol/fosfolípideo na membrana, o que estimularia a produção de β -amilóide (APP, a proteína precursora do β -amilóide,

e suas secretases estão localizadas em áreas da membrana ricas em colesterol) (RUDZITE et al., 1999).

Por outro lado, Varadkar e Surtees (2004) propuseram um efeito sinérgico entre o ácido 3-hidroxi-glutárico, principal neurotoxina acumulada nos fluidos e tecidos de pacientes portadores de acidemia glutárica tipo I, e os metabólitos da rota das quinureninas, com ênfase especial para o ácido quinolínico, na tentativa de explicar o dano neurológico característico dessa doença. De acordo com essa hipótese, a deficiência da enzima glutaril-CoA desidrogenase característica da doença bloquearia a via do glutarato, a qual levaria a um acúmulo de seus precursores, as quinureninas. Por outro lado, a ativação da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase na microglia pela inflamação intercorrente também aumentaria as concentrações das quinureninas, principalmente a do ácido quinolínico. Este seria o principal metabólito a exercer efeitos sinérgicos com o ácido 3-hidroxi-glutárico, visto que ambos teriam a capacidade de ativar os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA.

Embora associadas a várias doenças neurodegenerativas, até o presente momento pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais as quinureninas poderiam atuar nessas doenças.

I. 3 Metabolismo energético nas doenças neurodegenerativas

Numerosas hipóteses têm sido propostas para explicar a fisiopatologia das doenças de Alzheimer, Huntington e Parkinson, sem, no entanto, 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). Uma das hipóteses é de que alterações na cadeia transportadora de elétrons seria o evento etiológico primário na maioria dessas doenças (PARKER, 1989; PARKER et al., 1990, 1994; SWERDLOW et al., 1996, 1997).

O cérebro é altamente dependente de energia para seu funcionamento normal (ROSSEN et al., 1943) e a mitocôndria é a estrutura intracelular que mantém os suprimentos de energia para o cérebro. Uma alteração funcional nessa estrutura pode levar, portanto, a alterações patológicas nos neurônios e astrócitos (BEAL et al., 1993; BEAL, 1995; BOWLING e BEAL, 1995; DAVIS et al., 1995). Mutações no DNA mitocondrial e reações envolvendo geração de espécies reativas podem danificar a mitocôndria e diminuir a atividade dos complexos da cadeia respiratória. Um prejuízo no transporte de elétrons, além de causar um prejuízo na produção de ATP, leva a uma dispersão dos elétrons na forma de radicais livres potencialmente danosos à célula. Visto que os sistemas de defesa antioxidantes, como as enzimas superóxido dismutase, glutatona peroxidase, glutatona redutase e catalase, são relativamente deficientes no cérebro (MARKLUND et al., 1982; MARTILLA et al., 1988), um ciclo vicioso pode ocorrer, aumentando o dano oxidativo a neurônios e levando à morte neuronal característica de doenças neurodegenerativas. Um prejuízo na fosforilação oxidativa também reduz o bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial, diminuindo o potencial da membrana e, conseqüentemente, levando à abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial. Evidências sugerem que uma diminuição no potencial de membrana mitocondrial seja um evento primário na iniciação do processo apoptótico (WADIA et al., 1998).

Adicionalmente, dano neuronal e estresse oxidativo podem levar a mudanças reativas em astrócitos situados nas proximidades, levando a um aumento na

produção de citocinas pró-apoptóticas e pró-inflamatórias, bem como a uma alteração na homeostase de íons extracelulares e de aminoácidos neurotransmissores (MACCIONI et al., 2001). Além disso, mecanismos patogênicos das doenças neurodegenerativas podem estimular células da microglia, levando à produção de substâncias potencialmente neurotóxicas (MACCIONI et al., 2001).

Numerosas evidências relacionam doenças neurodegenerativas a uma diminuição no metabolismo energético. Estudos demonstraram uma diminuição na atividade do complexo I da cadeia respiratória em cérebros *postmortem* de pacientes portadores de doença de Parkinson (GU et al., 1998; JANETZKY et al., 1994; SCHAPIRA et al., 1989, 1990a,b). Também há relatos de defeitos nos complexos II e III da cadeia respiratória e na enzima α -cetoglutarato desidrogenase, importante enzima do ciclo do ácido cítrico, nessa doença (MIZUNO et al., 1990, 1994).

Na doença de Alzheimer, a mais comum dentre as doenças neurodegenerativas, é encontrada principalmente uma redução na atividade do complexo IV da cadeia respiratória (MAURER et al., 2000). Estudos de imagem *in vivo* demonstraram uma redução no metabolismo da glicose em pacientes portadores da doença de Alzheimer, e essa diminuição aparece precocemente, precedendo os sintomas clínicos, e se acentua com a severidade da doença (JAGUST et al., 1988; SMITH et al., 1992; KENNEDY et al., 1995; SMALL et al., 1995). Estudos em cérebros *postmortem* demonstraram uma diminuição na atividade do complexo enzimático da piruvato desidrogenase e na atividade da enzima α -cetoglutarato desidrogenase na doença de Alzheimer (PERRY et al., 1980; GIBSON et al., 1988; MASTROGIACOMO et al., 1993).

Na esclerose lateral amiotrófica, observou-se uma diminuição na atividade dos complexos I, III e IV da cadeia respiratória em mitocôndrias de células híbridas (SWERDLOW et al., 1998).

Por outro lado, vários estudos têm demonstrado uma diminuição na utilização de glicose em córtex cerebral de pacientes portadores da doença de Huntington (KUHL et al., 1982; HAYDEN et al., 1986; YOUNG et al., 1986; GRAFTON et al., 1992; KUWERT et al., 1993), além de um aumento nos níveis cerebrais de lactato (JENKINS et al., 1993). Também se observou uma redução na utilização de oxigênio, bem como na atividade dos complexos II, III e IV da cadeia respiratória no núcleo caudato de pacientes portadores dessa (BRENNAN et al., 1985; GU et al., 1996).

I. 4 Metabolismo intermediário no cérebro de mamíferos

O principal substrato energético para o cérebro de mamíferos adultos é a glicose, porém o padrão de utilização deste nutriente varia conforme a etapa de desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), o estado nutricional do indivíduo e o destino de sua cadeia de átomos de carbono (MARKS et al., 1996).

Nas primeiras horas após o nascimento, o lactato é a principal fonte de obtenção de energia cerebral em seres humanos (VICARIO et al., 1991). Com o início do período de amamentação, os corpos cetônicos, formados a partir da oxidação dos ácidos graxos contidos no leite, são utilizados em grandes quantidades pelo cérebro. Assim, durante as primeiras semanas de desenvolvimento, os corpos cetônicos se constituem como uma das principais fontes para obtenção de energia pelo cérebro (MILLER et al., 1982). Nesta fase, o consumo de glicose pelo cérebro é reduzido, aumentando gradativamente em poucas semanas. O equilíbrio entre o consumo de glicose e corpos cetônicos é alcançado por volta dos 18 dias de vida, quando a utilização de glicose se torna preferencial em condições normais (CRONE, 1965; CREMER et al., 1976).

O estado nutricional também dita o padrão de utilização de nutrientes pelo cérebro. Situações de jejum prolongado fazem com que o SNC passe a utilizar corpos cetônicos para obtenção de energia, a fim de poupar o organismo de um catabolismo protéico exacerbado resultante da necessidade da manutenção da glicemia via gliconeogênese (MARKS et al., 1996).

A glicose captada pelo cérebro é, no entanto, fonte de carbono para a síntese de diversas outras biomoléculas essenciais (por exemplo, neurotransmissores), o que reforça a idéia de que a utilização de glicose não está atrelada somente à produção de energia.

O ciclo do ácido cítrico é a via comum de oxidação dos glicídios, aminoácidos e ácidos graxos (aproximadamente 95% do ATP sintetizado). O metabolismo energético cerebral se mostra essencialmente aeróbico, sendo a glicose o principal substrato utilizado (CLARK et al., 1993), entrando no ciclo sob a forma de acetil-CoA, que é então oxidado completamente a CO_2 . As reações anapleróticas, que alimentam o ciclo fornecendo diretamente seus intermediários, também fornecem substratos para as reações de oxidação no cérebro. Quando não há hipóxia, a fosforilação oxidativa é dependente da concentração de ATP, ADP e fosfato inorgânico (P_i) e da razão mitocondrial de NADH/NAD^+ , que é determinada pela atividade da cadeia transportadora de elétrons e pelo fornecimento de elétrons por enzimas mitocondriais. A cadeia transportadora de elétrons oxida o NADH e bombeia prótons para o espaço intermembrana da mitocôndria formando assim um gradiente de prótons que ativa a ATP sintase que produz ATP na fosforilação oxidativa (ERECINSKA e SILVER, 1994).

A atividade do ciclo do ácido cítrico pode ser medida através da formação de CO_2 . Neste particular, diversos substratos marcados por isótopos radioativos são oxidados *in vitro* pelo cérebro até CO_2 . A utilização dessas substâncias tem auxiliado

no estudo do metabolismo energético cerebral a partir de diferentes pontos da rota aeróbica de oxidação, dependendo do substrato utilizado (por exemplo, glicose, acetato ou citrato) e da posição em que a molécula é marcada.

1.5 Fosforilação oxidativa

As coenzimas nucleotídicas reduzidas NADH e FADH₂, provenientes da oxidação de glicose, ácidos graxos, aminoácidos e intermediários do ciclo do ácido cítrico são moléculas com grande capacidade de liberar energia, pois contêm elétrons com alto potencial de transferência (STRYER, 1996).

A fosforilação oxidativa é o processo pelo qual o O₂ é reduzido a H₂O, por elétrons doados pelo NADH e FADH₂, que fluem por vários pares de redução-oxidação (cadeia respiratória), ocorrendo concomitantemente a produção de ATP a partir de ADP e Pi (NELSON e COX, 2000). Em eucariotos, a fosforilação oxidativa ocorre nas mitocôndrias, mais precisamente na cadeia respiratória, e é responsável pela maior parte da energia liberada pela célula (figura 1.2).

As mitocôndrias são corpúsculos envolvidos por uma membrana externa, facilmente permeável a pequenas moléculas e íons, e por uma membrana interna, impermeável à maioria das moléculas e íons, incluindo prótons H⁺ (NELSON e COX, 2000). A membrana interna é composta por aproximadamente 75% de proteínas. É livremente permeável somente a O₂, CO₂ e H₂O, e contém, além das proteínas da cadeia respiratória, várias proteínas de transporte que controlam a passagem de metabólitos, como piruvato, glicerolfosfato, malato, ácidos graxos, prótons e outras moléculas essenciais às funções mitocondriais (ABELES et al., 1992). A impermeabilidade controlada da membrana mitocondrial interna para a maioria dos íons e dos metabólitos permite a formação de um gradiente de íons através dessa barreira e resulta na compartimentalização das funções metabólicas entre o citosol e

a mitocôndria (VOET et al., 2000). O fluxo de elétrons a partir de NADH e FADH₂ até o O₂ (aceptor final de elétrons) se dá através de complexos enzimáticos ancorados na membrana mitocondrial interna com centros redox com afinidade crescente por elétrons. A seqüência de carreadores de elétrons, de um modo geral, reflete seus potenciais de redução relativos, sendo o processo global de transporte de elétrons exergônico.

A cadeia respiratória é composta por vários complexos enzimáticos e uma coenzima lipossolúvel, a coenzima Q ou ubiquinona (DI DONATO, 2000). O complexo I, conhecido como NADH desidrogenase ou NADH: ubiquinona oxidorreductase, transfere os elétrons do NADH para a ubiquinona. O complexo II, succinato desidrogenase, reduz a ubiquinona com elétrons do FADH₂ provenientes da oxidação do succinato a fumarato no ciclo do ácido cítrico. O complexo III, citocromo *bc*₁ ou ubiquinona-citocromo *c* oxidorreductase, catalisa a redução do citocromo *c* a partir dos elétrons provenientes da ubiquinona reduzida. O complexo IV, conhecido como citocromo *c* oxidase, catalisa a transferência dos elétrons do citocromo *c* reduzido para o O₂, reduzindo-o a H₂O. Todos esses complexos possuem grupamentos prostéticos (grupamento heme, por exemplo) específicos para desempenharem o papel de aceptores e doadores de elétrons (ABELES et al., 1992).

O fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia respiratória é acompanhado pelo bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. Com isso, cria-se um gradiente eletroquímico transmembrana utilizado por um quinto complexo protéico, a ATP sintase, para a síntese de ATP. Dessa forma, a oxidação de substratos energéticos está acoplada ao processo de fosforilação do ADP, ou seja, quando o fluxo de prótons volta a favor do gradiente eletroquímico, a energia liberada é utilizada pela ATP sintase, que funciona como

uma bomba de prótons dependente de ATP trabalhando no sentido reverso, para liberar o ATP (NELSON e COX, 2000).

Além do possível déficit na produção de ATP, que se constitui na principal moeda energética para os processos celulares, algumas doenças genéticas e outros distúrbios que interfiram na cadeia respiratória aumentam os níveis de NADH, inibindo o ciclo do ácido cítrico e impedindo a entrada de piruvato neste. Como consequência, o piruvato é convertido a lactato, cujos níveis se elevam no sangue do indivíduo (VOET e VOET, 1990).

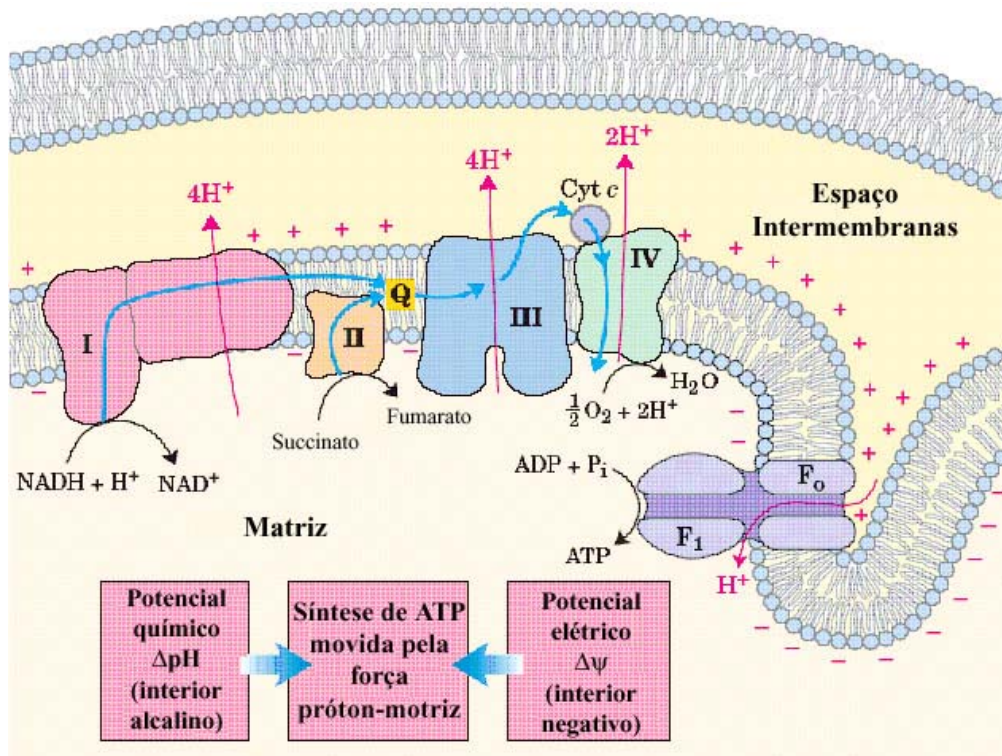
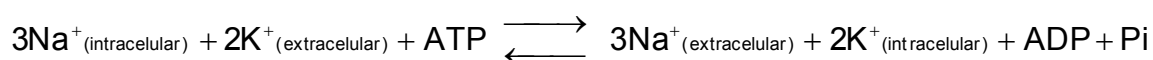


Figura I.2 Fluxo de elétrons através dos quatro complexos da cadeia respiratória. O gradiente eletroquímico transmembrana formado possibilita a síntese de ATP pela ATP-sintase (adaptado de NELSON e COX, 2004).

I. 6 Na⁺,K⁺-ATPase

A enzima Na⁺,K⁺-ATPase é uma proteína transmembrana constituída por dois tipos de subunidades: a subunidade α de 110kD, que contém os sítios catalíticos e de ligação de íons, e a subunidade β , que é uma glicoproteína de 55kD de função desconhecida, formando uma estrutura dimérica $(\alpha\beta)_2$. A função dessa enzima é translocar os cátions Na⁺ e K⁺ através da membrana plasmática contra seus gradientes de concentração, utilizando a energia fornecida pela hidrólise de trifosfato de adenosina (ATP) (figura I.3). A enzima transporta simultaneamente 3 íons Na⁺ para fora e 2 íons K⁺ para dentro da célula. A saída de Na⁺ capacita as células animais a controlar osmoticamente seu conteúdo hídrico. Visto que três cargas positivas são transportadas para o meio extracelular e somente duas são transportadas para o meio intracelular, o fluxo de íons Na⁺ e K⁺ produz um gradiente eletroquímico através da membrana celular (LINGREL e KUNTZWEILER, 1994). Esse gradiente é usado como fonte de energia para a despolarização e repolarização do potencial de membrana, para a manutenção e regulação do volume celular, para transporte ativo, transporte dependente de íon Na⁺, de glicose, de aminoácidos, de neurotransmissores e para cotransporte/antiporte de outros íons (GEERING, 1990). Todas as células eucarióticas superiores consomem o ATP por elas produzido para a manutenção das concentrações citosólicas e extracelulares de Na⁺ e K⁺, sendo que esse consumo pode ser da ordem de 40 a 60% nas células neuronais (WHITTAN, 1962).

A reação catalisada pela Na⁺,K⁺-ATPase é a seguinte:



Alteração nos mecanismos que mantêm o equilíbrio entre a taxa de sódio e potássio intra e extracelular pode causar graves conseqüências nas células do SNC

(ERECINSKA e SILVER, 1994), tendo sido associadas a despolarização excessiva, instabilidade da membrana e descargas paroxísticas (DONALDSON et al., 1977).

Glicosídeos cardiotônicos, tais como a digoxina e a ouabaína, inibem a enzima Na^+, K^+ -ATPase, ligando-se a um sítio específico na porção extracelular da proteína (LINGREL e KUNTZWEILER, 1994). Baixas doses de ouabaína (0,1 nmol), quando injetadas intracerebralmente em ratos, produzem lesões neuronais seletivas e, em altas doses (1 nmol), produzem necrose celular e infarto (LEES et al., 1990). O efeito de radicais livres sobre a Na^+, K^+ -ATPase tem sido citado como a principal fonte de dano celular na reperfusão ocorrida após uma isquemia do miocárdio. Estudos têm demonstrado uma inibição *in vitro* da enzima quando exposta a radicais hidroxila (HITSCHKE et al., 1994), bem como quando exposta a sistemas artificiais produtores de radicais livres em homogeneizado de cérebro de ratos (TSAKIRIS et al., 2000).

Diversos estudos têm avaliado o funcionamento da Na^+, K^+ -ATPase em tecido normal e tecido obtido de foco epiléptico na tentativa de identificar anormalidades na função da enzima que possam estar correlacionadas com tal patologia. Hanglund e colaboradores (1985) demonstraram que uma menor atividade da enzima em regiões cerebrais parece estar relacionada a anormalidades encontradas em crises convulsivas, talvez refletindo uma menor atividade na regulação do potássio extracelular. Rapport e colaboradores (1975) encontraram uma diminuição de 60% na atividade da Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral obtido de paciente que apresentava convulsões generalizadas intratáveis. Além disso, a inibição da enzima está associada à liberação de neurotransmissores em uma variedade de preparações neuronais (JACOBSON et al., 1986).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que alguns aminoácidos inibem a atividade da Na^+, K^+ -ATPase. A fenilalanina e seus metabólitos desaminados (fenilpiruvato,

fenilacetato e fenilactato) inibem *in vitro* a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em torno de 20% (WYSE et al., 1995). Bürger (1998) demonstrou semelhante inibição para leucina, valina, isoleucina e seus cetoácidos, compostos acumulados na doença do xarope do bordo.

Através de estudos dos efeitos *in vivo* da administração de fenilalanina sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase de córtex cerebral de ratos, Wyse e colaboradores (1995) demonstraram que na hiperfenilalaninemia experimental produzida pela administração crônica de fenilalanina ocorre uma diminuição significativa na atividade específica da Na^+, K^+ -ATPase.

Posteriormente, Wyse e colaboradores (1998) mostraram que, tanto a administração crônica de ácido propiônico, como a presença desse ácido no meio de incubação, inibem a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral de ratos.

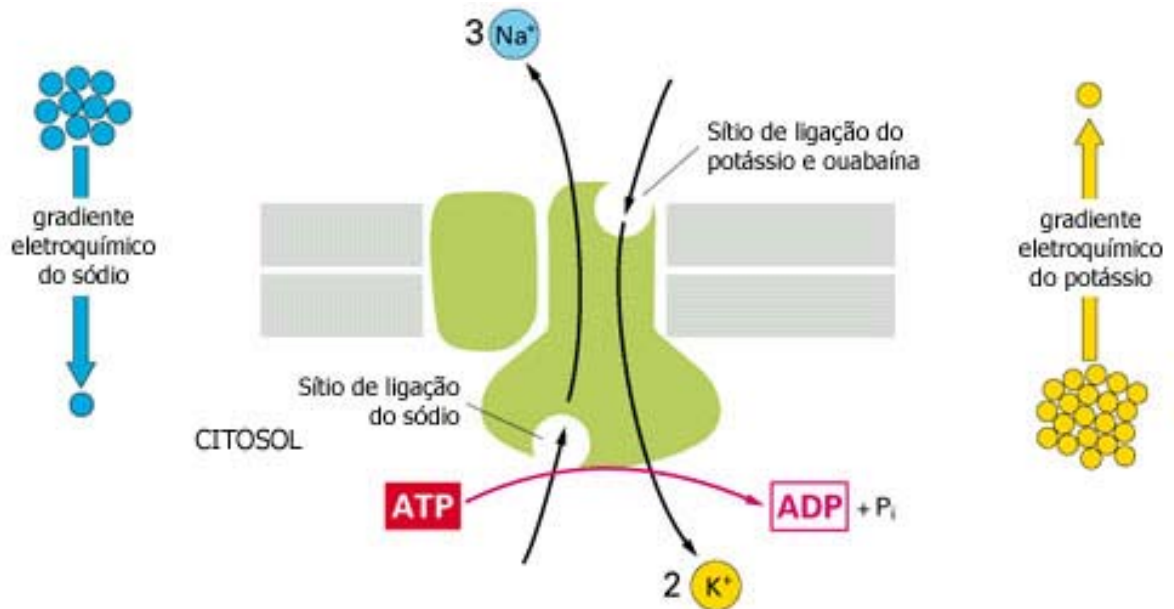


Figura I.3 Transporte transmembrana de íons realizado pela enzima Na^+, K^+ -ATPase. (Adaptado de ALBERTS et al., 2002).

II OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos *in vitro* de algumas quinureninas, tais como a L-quinurenina (QUI), o ácido quinurênico (AK), a 3-hidroxiquinurenina (3HQ), o ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA), o ácido antranílico (AA) e o ácido quinolínico (AQ), sobre parâmetros importantes do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens, já que as concentrações de algumas dessas substâncias se encontram alteradas em várias doenças neurodegenerativas em que foi demonstrada disfunção mitocondrial.

II. 1 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de QUI, AK, 3HQ, 3HA, AA e AQ sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.
- Avaliar o efeito de QUI, AK, 3HQ, 3HA, AA e AQ sobre a produção de CO₂ a partir de D-[U-¹⁴C] glicose, ácido [1-¹⁴C]acético e ácido [1,5-¹⁴C]cítrico em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.
- Avaliar o efeito de QUI, AK, 3HQ, 3HA, AA e AQ sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.
- Avaliar o efeito de QUI, AK, 3HQ, 3HA, AA e AQ sobre a atividade dos complexos enzimáticos I-III, II, II-III e IV da cadeia respiratória e da enzima succinato desidrogenase em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.
- Avaliar o efeito de QUI, AK, 3HQ, 3HA, AA e AQ sobre a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em membranas sinápticas isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.

III MATERIAL E MÉTODOS

III. 1 Reagentes

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

Os metabólitos L-quinurenina (QUI), ácido quinurênico (AK), 3-hidroxiquinurenina (3HQ), ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA), ácido antranílico (AA) e ácido quinolínico (AQ) foram sempre dissolvidos e diluídos na solução tampão específica de cada técnica no dia da realização dos ensaios.

III. 1. 1 Reagentes utilizados

- 1,4-bis[2-(5-fenil-oxazolil)]benzeno (POPOP) – Sigma
- 2,6-Dicloroindofenol (DCIP) – Sigma
- 2-difenil-oxazol (PPO) – Sigma
- 3-Hidroxiquinurenina – Sigma
- Ácido [1,5-¹⁴C]cítrico – Amersham
- Ácido [1-¹⁴C]acético – Amersham
- Ácido 3-[N-morfolino]propano-sulfônico (MOPS) – Sigma
- Ácido 3-hidroxi-antranílico – Sigma
- Ácido antranílico – Sigma
- Ácido cítrico – Merck
- Ácido clorídrico – Merck
- Ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) – Sigma
- Ácido etilenoglicol-bis(2-amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetra-acético (EGTA) – Sigma

- Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etano sulfônico (HEPES) – Sigma
- Ácido orto-fosfórico – Merck
- Ácido quinolínico – Sigma
- Ácido quinurênico – Sigma
- Ácido tricloroacético (TCA) – Reagen
- Adenosina-5'-trifosfato (ATP) – Sigma
- Albumina bovina – Sigma
- Álcool etílico absoluto – Nuclear
- Álcool polivinílico – Vetec
- Azida sódica – Sigma
- Bicarbonato de potássio – Reagen
- Bicarbonato de sódio – Merck
- Borohidrato de sódio – Sigma
- Carbonato de sódio – Merck
- Cianeto de potássio – Merck
- Citocromo *c* – Sigma
- Cloreto de cálcio di-hidratado – Sigma
- Cloreto de magnésio hexa-hidratado – Sigma
- Cloreto de potássio – Synth
- Cloreto de sódio – Sigma
- Coomassie Brilhante Blue G – Sigma
- D-[U-¹⁴C] glicose – Amersham
- D-Glicose – Sigma
- Ferricianeto de potássio – Vetec
- Folin Ciocalteau – JLC

- Fosfato de potássio dibásico – Reagen
- Fosfato de potássio monobásico – Merck
- Heparina 5000 UI/mL – Cristália
- Hidróxido de benzetônio (hiamina) solução – Sigma
- Hidróxido de sódio – Vetec
- Kit Glicose PAP Liquiform – Labtest Diagnóstica
- Líquido de cintilação Optiphase Hi Safe 3 – Wallac
- L-Quinurenina – Sigma
- Metassulfato de fenazina (PMS) – Sigma
- Mistura carbogênica CO₂:O₂ (5:95 %) – White Martins
- Molibdato de amônio – Vetec
- N-Dodecil β-D-maltosídeo (lauril-maltosídeo) – Sigma
- Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (β-NADH) – Sigma
- Ouabaína – ICN
- Rotenona – Sigma
- Sacarose – Reagen
- Succinato de sódio hexa-hidratado – Sigma
- Sulfato cúprico – Baker
- Sulfato de magnésio hepta-hidratado – Reagen
- Tartarato de sódio e potássio – Orion
- t-Octilfenoxipolietoxietanol (triton X-100) – Sigma
- Tolueno – Nuclear
- Trisma base – Sigma
- Verde malaquita – Sigma

III. 2 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 metabólico Dubnoff
- Banho-maria Biomatic modelo 1052
- Centrífuga Du Pont modelo Sorvall RC 5B Plus
- Centrífuga Eppendorf modelo 5403
- Contador de cintilação líquida Wallac modelo 1409
- Deionizador
- Destilador
- Espectrofotômetro Hitachi modelo U-2001 com leitura cinética e controle de temperatura
- Fatiador de tecido McIlwain
- Freezer -20°C Prosdócimo modelo H5
- Freezer -70°C Scien Temp
- 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
- Ultracentrífuga Hitachi modelo Himac CP 70 MX
- 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. 3 Animais

Foram utilizados ratos Wistar de 30 dias de idade, de ambos os sexos, fornecidos pelo Biotério do Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS. Os ratos foram mantidos em ciclos de claro-escuro de ± 12 horas a uma temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Os animais tinham livre acesso à água e ao alimento (ração Supra ou Purina, São Leopoldo, RS).

III. 4 Captação de glicose por fatias de córtex cerebral de ratos jovens

A captação de glicose por fatias de córtex cerebral foi determinada na presença de 0,1, 1, 10 ou 100 μM de L-quinurenina (QUI), ácido quinurênico (AK), 3-hidroxiquinurenina (3HQ), ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA), ácido antranílico (AA) ou ácido quinolínico (AQ). Os controles não continham nenhum dos metabólitos. Esses compostos foram dissolvidos e diluídos na solução tampão específica para a técnica, e os experimentos foram realizados em duplicata.

III.4.1 Preparação do tecido

Os animais foram sacrificados por decapitação sem anestesia. O cérebro foi rapidamente removido e dissecado sobre placa de Petri em gelo para a obtenção do córtex cerebral, de onde todo o sangue visível foi removido com auxílio de um papel

filtro. O córtex cerebral foi então pesado e cortado em fatias de aproximadamente 400 µm de espessura utilizando-se um fatiador McIlwain.

III.4.2 Captação de glicose

Fatias de córtex cerebral foram pesadas (aproximadamente 50 mg) e colocadas em frascos contendo tampão Krebs-Ringer bicarbonato, pH 7,4.

Os frascos foram pré-incubados em um banho metabólico a 35° C por 15 minutos (90 oscilações por minuto). Após a pré-incubação, adicionou-se glicose ao meio de incubação para uma concentração final de 5 mM. Foi, então, retirada uma alíquota de 20 µL deste meio, na qual foi determinada a quantidade de glicose presente pelo método da glicose oxidase, utilizando-se o kit comercial Glicose PAP Liquiform Labtest. Os tubos foram, então, incubados sob uma atmosfera de O₂/CO₂ (95:5) por 60 minutos. Após essa incubação, foi retirada uma nova alíquota de 20 µL, na qual novamente foi determinada a quantidade de glicose. A captação de glicose pelo tecido foi obtida pela diferença entre a concentração de glicose no início e no final da incubação. A captação de glicose foi expressa em porcentagem do controle.

III. 5 Produção de CO₂ por homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens

A produção de CO₂ por homogeneizados de córtex cerebral foi determinada a partir de três diferentes substratos no meio de incubação que continha:

- D-[U-¹⁴C]glicose (0,055 µCi), na presença de 5 mM de D-glicose
- ácido [1-¹⁴C]acético (0,055 µCi), na presença de 1 mM de ácido acético
- ácido [1,5-¹⁴C]cítrico (0,23 µCi), na presença de 1 mM de ácido cítrico

Os tubos testes continham 0,1, 1, 10 ou 100 μM de L-quinurenina (QUI), ácido quinurênico (AK), 3-hidroxiquinurenina (3HQ), ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA), ácido antranílico (AA) ou ácido quinolínico (AQ). Os controles não continham nenhuma das substâncias citadas acima.

III. 5.1 Preparação do tecido

Os animais foram sacrificados por decapitação sem anestesia. O cérebro foi rapidamente removido e dissecado sobre placa de Petri em gelo para a obtenção do córtex cerebral, de onde todo o sangue visível foi removido com auxílio de um papel filtro. O córtex cerebral foi então pesado e homogeneizado na proporção de 1:10 em solução tampão Krebs-Ringer bicarbonato pH 7,4, previamente aerada com mistura carbogênica durante aproximadamente 10 minutos.

III. 5. 2 Captação de CO_2

Um volume de 450 μL de homogeneizado, contendo aproximadamente 45 mg de córtex cerebral, foi pré-incubado na presença de 1,4 mM de lauril-maltosídeo durante 15 minutos a 35°C em banho metabólico com agitação. Após, foram acrescentados ao meio de incubação os substratos marcados e os metabólitos a serem testados. Os frascos foram fechados com tampas de borracha contendo poços de vidro com papel filtro dobrado em forma de "W", vedados com parafilme e devolvidos ao banho. Transcorrida 1 hora de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 200 μL de TCA 50% ao homogeneizado. Foram adicionados então 100 μL de hiamina ou hidróxido de sódio 2 M dentro dos poços. Os frascos foram devolvidos ao banho por 30 minutos para que o CO_2 pudesse ser incorporado ao papel filtro impregnado por hiamina ou NaOH. Terminado este procedimento, o papel filtro embebido em hiamina ou NaOH 2 M foi retirado com o auxílio de uma

pinça e de uma micropipeta, sendo transferido para vials de plástico. Em cada vial foram adicionados 1,5 mL de líquido de cintilação PPO/POPOP/triton/etanol/tolueno (2,678 g/ 0,179 g/325 µL/ 107 µL / tolueno q.s.p 500 mL) quando da adição de hiamina nos poços, ou de líquido de cintilação Opti Phase “Hi Safe” 3 quando da adição de NaOH 2 M. Posteriormente, os vials foram agitados e a radioatividade incorporada ao CO₂ foi determinada em contador de cintilação líquida. A produção de CO₂ foi expressa em percentagem do controle.

III. 6 Determinação da atividade dos complexos da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos jovens

III. 6.1 Determinação da atividade do complexo I da cadeia respiratória (NADH desidrogenase) em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens

A atividade do complexo I da cadeia respiratória foi determinada de acordo com o método de Cassina e Radi (1996) na presença de 0,1, 1, 10 ou 100 µM de L-quinurenina (QUI), ácido quinurênico (AK), 3-hidroxiquinurenina (3HQ), ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA), ácido antranílico (AA) ou ácido quinolínico (AQ). Os controles não continham nenhum dos metabólitos. Os compostos foram dissolvidos e diluídos na solução tampão específica para a técnica, e os experimentos foram realizados em duplicata.

III. 6. 1. 1 Preparação mitocondrial

Os animais foram sacrificados por decapitação sem anestesia. O cérebro foi rapidamente removido e dissecado sobre placa de Petri em gelo para a obtenção do córtex cerebral, de onde todo o sangue visível foi removido com auxílio de um papel filtro. O córtex cerebral foi então pesado e homogeneizado na proporção de 1:10

(p/v) em solução tampão contendo 0,3 M de sacarose, 5 mM MOPS, 5 mM de fosfato de potássio, 1 mM de EGTA e 0,1 % de albumina bovina, pH 7,4. O homogeneizado foi centrifugado a 1500 x *g*, e as mitocôndrias foram isoladas do sobrenadante por uma segunda centrifugação a 10000 x *g*. O sedimento contendo as mitocôndrias foi, então, suspenso no tampão citado acima, em uma concentração final de proteína de aproximadamente 25-35 mg/mL. Essas mitocôndrias foram armazenadas a -70° C por no máximo 7 dias até a determinação da atividade enzimática.

III. 6. 1. 2 Determinação da quantidade de proteína

O conteúdo protéico foi determinado pelo método de LOWRY et al. (1951), utilizando-se albumina bovina como padrão.

III. 6. 1. 3 Determinação da atividade do complexo I da cadeia respiratória

O meio de reação foi feito em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,4, contendo ferricianeto de potássio 0,5 mM, rotenona 5 μ M e 0,1 mg/mL de proteína (preparação mitocondrial). A reação foi iniciada pela adição de NADH a uma concentração final de 200 μ M. A redução do ferricianeto a 420 nm e 37° C foi acompanhada na presença ou na ausência dos compostos a serem testados durante 3 minutos. A atividade foi expressa em mmol de ferricianeto reduzido/min/mg proteína.

III. 6. 2 Determinação das atividades dos complexos I-III, II, II-III e IV da cadeia respiratória e da enzima succinato desidrogenase em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens

A atividade dos complexos da cadeia respiratória foi determinada na presença de 0,1, 1, 10 ou 100 μM de L-quinurenina (QUI), ácido quinurênico (AK), 3-hidroxiquinurenina (3HQ), ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA), ácido antranílico (AA) ou ácido quinolínico (AQ). Os controles não continham nenhum dos metabólitos. Os compostos foram dissolvidos e diluídos na solução tampão específica para a técnica, e os experimentos foram realizados em duplicata.

III. 6. 2. 1 Preparação do tecido

Os animais foram sacrificados por decapitação sem anestesia. O cérebro foi rapidamente removido e dissecado sobre placa de Petri em gelo para a obtenção do córtex cerebral, de onde todo o sangue visível foi removido com auxílio de um papel filtro. O córtex cerebral foi então pesado e homogeneizado 1:20 (p/v) em tampão SETH (sacarose 250 mM, EDTA 2 mM, Trisma base 10 mM e heparina dissolvidos em água destilada e deionizada q.s.p 50 mL) pH 7,4. Os homogeneizados foram centrifugados a 800 x g por 10 minutos e os sobrenadantes separados em alíquotas de 300 μL e mantidos a -70°C por um período máximo de um mês até o momento das determinações enzimáticas.

No momento das determinações, as amostras foram congeladas e descongeladas por duas vezes consecutivas para a determinação dos complexos II, II-III e I-III.

III. 6. 2. 2 Determinação da quantidade de proteína

O conteúdo protéico foi determinado pelo método de LOWRY et al. (1951), utilizando-se albumina bovina como padrão.

III. 6. 2. 3 Determinação da atividade do complexo I-III (NADH: citocromo c oxirredutase)

Ao meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 20 mM pH 8, cianeto de potássio 2 mM, EDTA 10 μ M, citocromo c 50 μ M, foram adicionados 10 a 25 μ g de proteína do homogeneizado e 25 μ M de NADH, iniciando a reação. A redução do citocromo c a 550 nm e 25°C foi registrada na presença e na ausência dos compostos por 3 minutos, após os quais foram adicionados 10 μ M de rotenona. As absorvâncias foram registradas por mais 3 minutos. A diferença entre os dois momentos de leitura correspondeu à atividade da NADH: citocromo c oxirredutase sensível à rotenona (SCHAPIRA et al., 1990). A atividade foi expressa em nmol de citocromo c reduzido/min/mg de proteína.

III. 6. 2. 4 Determinação da atividade do complexo II (succinato: DCIP oxirredutase) e succinato desidrogenase (SDH)

As atividades enzimáticas do complexo II e da SDH foram determinadas de acordo com FISCHER et al. (1985). Ao meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio (K_2HPO_4/KH_2PO_4) 62,5 mM pH 7,4, succinato de sódio 1 mM, dicloroindofenol (DCIP) 9 μ M, foi adicionada amostra contendo cerca de 80 a 140 μ g de proteína. Tubos testes e controles foram incubados durante 20 minutos, protegidos da luz, a 30°C em banho-maria. Após a incubação, foram adicionados azida sódica 4,3 mM, rotenona 7 μ M e DCIP 42 μ M.

A redução do DCIP foi determinada em 600 nm de comprimento de onda e 25°C durante 5 minutos para a medida da atividade global do complexo II. Transcorridos os primeiros 5 minutos, foi adicionado metassulfato de fenazina (PMS) 1mM para a determinação da atividade da SDH, também pela redução do DCIP, por mais 5 minutos. Ambas as atividades foram expressas em nmol de DCIP reduzido/min/mg de proteína.

III. 6. 2. 5 Determinação da atividade do complexo II-III (succinato: citocromo c oxirredutase)

Ao meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 40 mM pH 7,4, succinato de sódio 1 mM foi adicionada amostra contendo 40 a 80 µg de proteína. Tubos testes e controles foram incubados por 30 minutos a 30°C. Em seguida, foram adicionados 4 mM de azida sódica e 7 µM de rotenona e a reação foi iniciada pela adição de 0,6 µg/mL de citocromo c. A redução do citocromo c foi registrada em 550 nm de comprimento de onda a 25°C durante 5 minutos (FISCHER et al.,1985). A atividade foi expressa em nmol de citocromo c reduzido/min/mg de proteína.

III. 6. 2. 6 Determinação da atividade do complexo IV (citocromo c oxidase)

A atividade da citocromo c oxidase (COX) foi medida pelo método de Rustin et al. (1994). A oxidação do citocromo c, previamente reduzido com borohidrato de sódio, foi registrada a 25°C em 550 nm de comprimento de onda durante 10 min, na presença e na ausência das substâncias a serem testadas. O meio de incubação continha tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7, lauril-maltosídeo 0,6 mM e amostra com 2 a 4 µg de proteína. A reação foi iniciada com a adição de 0,7 µg de citocromo c reduzido. A atividade foi expressa em nmol de citocromo c oxidado/min/mg de proteína.

III. 7 Determinação da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens

A atividade da Na⁺,K⁺-ATPase foi determinada na presença de 0,1, 1, 10 ou 100 µM de L-quinurenina (QUI), ácido quinurênico (AK), 3-hidroxiquinurenina (3HQ), ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA), ácido antranílico (AA) ou ácido quinolínico (AQ). Os controles não continham nenhum dos metabólitos. Os compostos foram dissolvidos e diluídos na solução tampão específica para a técnica, e os experimentos foram realizados em duplicata.

III. 7. 1 Preparação de membranas plasmáticas sinápticas

As membranas foram preparadas de acordo com o método de Jones e Matus (1974). Os animais foram sacrificados por decapitação sem anestesia. O cérebro foi rapidamente removido e dissecado sobre placa de Petri em gelo para a obtenção do córtex cerebral, de onde todo o sangue visível foi removido com auxílio de um papel filtro. O córtex cerebral foi então pesado e homogeneizado em 10 volumes de uma solução contendo 0,32 mM de sacarose, 5,0 mM de HEPES e 0,1 mM de EDTA. O homogeneizado foi centrifugado a 1000 x g por 10 minutos a 4°C. A solução sobrenadante foi separada e novamente centrifugada a 12000 x g por 20 minutos a 4°C. O sedimento resultante foi suspenso em uma solução hipotônica de Tris-HCl 5 mM pH 8,1, sendo mantido em gelo durante 30 minutos para que ocorresse a lise dos sinaptossomas. Sobre este lisado foi montado um gradiente descontínuo de sacarose constituído de três camadas de diferentes concentrações (48, 28,5 e 10%). Este gradiente, contendo a amostra misturada à fração mais densa de sacarose (48%), foi centrifugado a 69000 x g por 2 horas a 4°C. Conforme Jones e Matus (1974), após esta centrifugação, a fração de menor concentração (sacarose 10%) é

composta basicamente por mielina; a fração intermediária é constituída principalmente por membranas plasmáticas sinápticas (situadas na interface das soluções 28,5 e 48%) e a última fração (sedimento), composta por mitocôndrias. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, a fração intermediária foi aspirada e suspensa em tampão Tris-HCl 5 mM pH 8,1, sendo centrifugada a 37000 x g durante 20 minutos a 4°C, para remoção da sacarose residual. O sedimento, contendo as membranas plasmáticas sinápticas purificadas, foi suspenso no tampão anteriormente citado de modo a obter-se uma concentração final de proteínas entre 0,15 e 0,25 mg/mL. As amostras foram então separadas em alíquotas e armazenadas a -70°C até o momento da determinação enzimática.

III. 7. 2 Determinação da quantidade de proteína

A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

III. 7. 3 Determinação da atividade enzimática

A atividade da Na⁺,K⁺-ATPase foi medida conforme o método de Tsakiris e Deliconstantinus (1984). O meio de reação continha cloreto de magnésio 5 mM, cloreto de sódio 80 mM, cloreto de potássio 20 mM, Tris-HCl 40 mM pH 7,4 em um volume final de 200 µL. A atividade de outras ATPases foi medida na presença de ouabaína 1 mM (inibidor específico da Na⁺,K⁺-ATPase). A atividade da Na⁺,K⁺-ATPase foi então calculada como sendo o resultante da diferença entre a atividade obtida pelas ATPases no meio sem ouabaína e a atividade das ATPases do meio contendo ouabaína. As amostras de membranas sinápticas foram adicionadas ao meio em um volume de 10 µL (0,015 - 0,03 µg de proteína) e pré-incubadas na presença ou ausência das substâncias a serem testadas a 37°C durante 10 minutos.

A reação foi iniciada pela adição de ATP 3 mM e o término, após 5 minutos de incubação a 37°C, ocorreu pela adição de 200 µL de TCA 10%. O fosfato inorgânico (Pi) liberado durante a incubação foi medido pelo método de Chan, Delfert e Junger (1986). A atividade enzimática foi expressa em nmol de Pi liberado/min/mg de proteína.

III. 8 Análise estatística

Os resultados foram expressos por média \pm erro padrão da média e analisados usando o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 11.0 em um computador PC compatível. Os testes estatísticos utilizados foram análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de múltipla amplitude de Duncan quando o valor de F foi significativo, o teste *t* de Student para amostras pareadas e regressão linear. Um $p < 0,05$ foi considerado significativo.

IV RESULTADOS

IV. 1 Efeito *in vitro* da L-quinurenina sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.

IV. 1. 1 Efeito *in vitro* da L-quinurenina (QUI) sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura IV.1 mostra que a L-quinurenina, nas concentrações de 0,1 a 100 μM , não exerceu nenhum efeito significativo sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens [$F(4,25)=0,239$; $p>0,05$].

IV.1. 2 Efeito *in vitro* da L-quinurenina (QUI) sobre a produção de CO_2 a partir de glicose e acetato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

As figuras IV.2 e IV.3 mostram que a QUI não exerceu qualquer efeito significativo sobre a produção de CO_2 a partir de glicose [$F(4,24)=1,86$; $p>0,05$] e acetato [$F(4,25)=0,69$; $p>0,05$], respectivamente. No entanto, pode-se observar uma tendência à diminuição na produção de CO_2 a partir de glicose (aproximadamente 25%) quando foram utilizadas doses a partir de 1 μM de L-quinurenina.

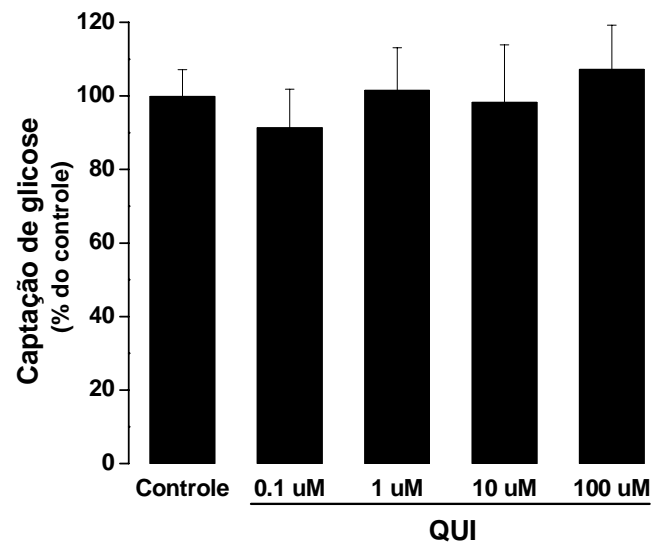


Figura IV.1. Efeito *in vitro* da L-quinurenina (QUI) sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão ($n=6$) e estão expressos como porcentagem dos controles (média dos controles: $469,5 \pm 17,83$ μmol de glicose/h/g tecido). Não houve diferença significativa entre as médias dos vários grupos (ANOVA).

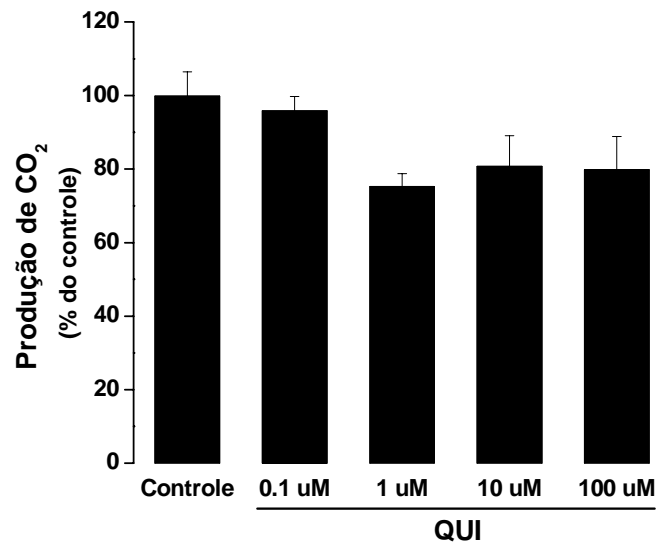


Figura IV.2 Efeito *in vitro* da L-quinurenicina (QUI) sobre a produção de CO₂ a partir de glicose em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=5-6). Os dados estão expressos em percentagem do controle (média dos controles: $3098 \pm 208,2$ nmol de glicose convertidos a CO₂/h/g de tecido). Não houve diferença significativa entre as médias dos vários grupos (ANOVA).

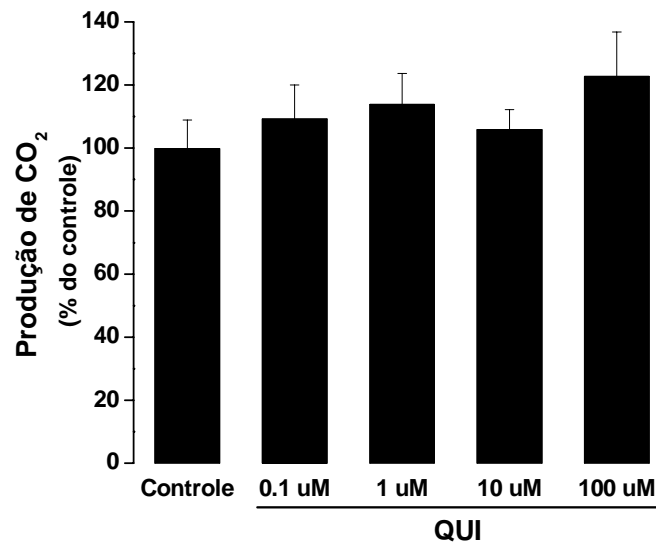


Figura IV.3 Efeito *in vitro* da L-quinurenicina (QUI) sobre a produção de CO₂ a partir de acetato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em percentagem do controle (média dos controles: 3314,7 \pm 300,02 nmol de acetato convertidos a CO₂/h/g de tecido). Não houve diferença significativa entre as médias dos vários grupos (ANOVA).

IV. 1. 3 Efeito *in vitro* da L-quinurenina sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos jovens.

IV. 1. 3. 1 Efeito *in vitro* da L-quinurenina (QUI) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.

Para se avaliar o efeito da L-quinurenina sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória foram utilizadas preparações mitocondriais purificadas de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura IV.4 mostra que a QUI não exerceu qualquer efeito significativo sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens [$t(4)=4,707$; $p>0,05$].

IV. 1. 3. 2 Efeito *in vitro* da L-quinurenina (QUI) sobre as atividades dos complexos I-III, II, II-III e IV da cadeia respiratória e da enzima succinato desidrogenase em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Para se avaliar o efeito da L-quinurenina sobre a atividade dos complexos I-III, II, II-III e IV da cadeia respiratória e da enzima succinato desidrogenase foram utilizados homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

A QUI não exerceu qualquer efeito significativo sobre as atividades dos complexos I-III [$F(4,20)=2,169$; $p>0,05$] (figura IV.5), II [$F(4,25)=1,335$; $p>0,05$] (figura IV.6), II-III [$F(4,25)=1,260$; $p>0,05$] (figura IV.7) e IV [$t(5)=1,006$; $p>0,05$] (figura IV.8) da cadeia respiratória, bem como sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase [$F(4,25)=0,742$; $p>0,05$] (figura IV.9) em homogeneizado de córtex

cerebral de ratos jovens. No entanto, pode-se observar uma tendência à diminuição na atividade do complexo II e da SDH na presença de L-quinurenina.

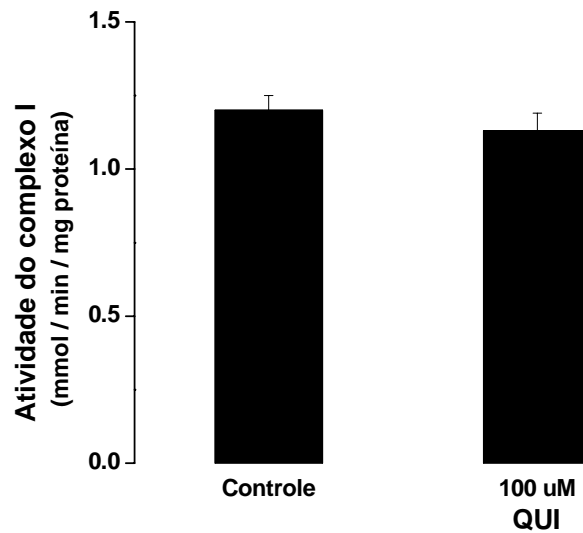


Figura IV.4 Efeito *in vitro* da L-quinurenina (QUI) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em mmol de ferricianeto reduzido/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados pelo teste *t* de Student para amostras pareadas. Não houve diferença significativa entre os grupos.

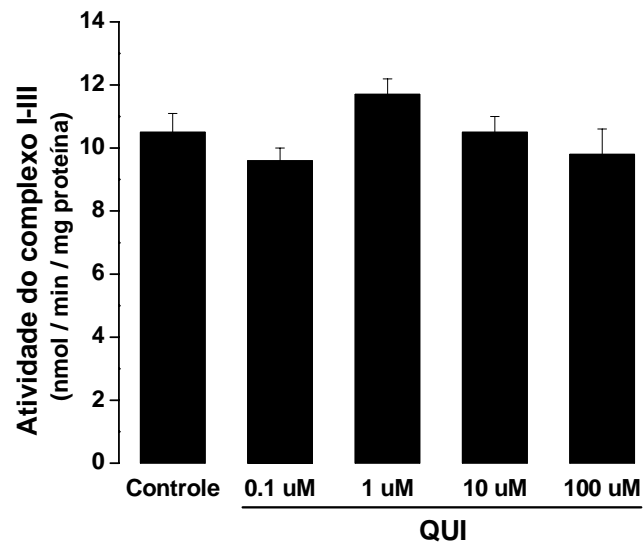


Figura IV.5 Efeito *in vitro* da L-quinurenia (QUI) sobre a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=5). Os dados estão expressos em nmol de citocromo c reduzido/min/mg proteína. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

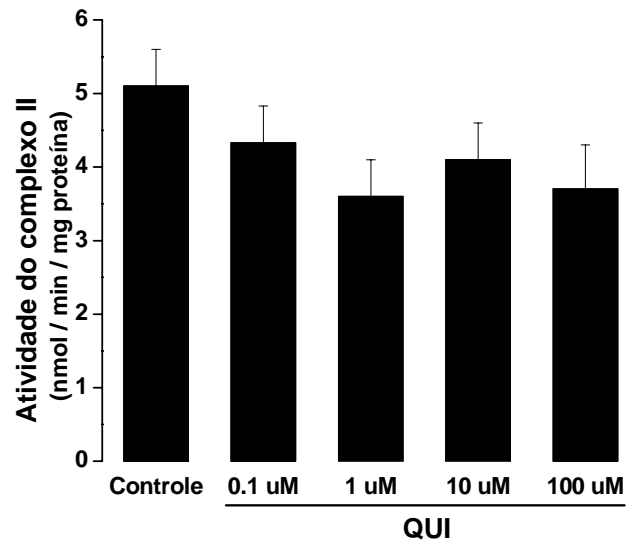


Figura IV.6 Efeito *in vitro* da L-quinurenina (QUI) sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em nmol de DCIP reduzido/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

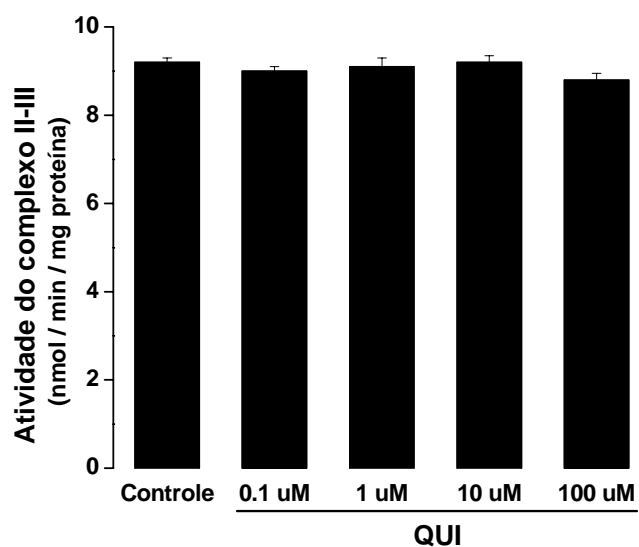


Figura IV.7 Efeito *in vitro* da L-quinurenina (QUI) sobre a atividade do complexo II-III da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em nmol de citocromo *c* reduzido/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

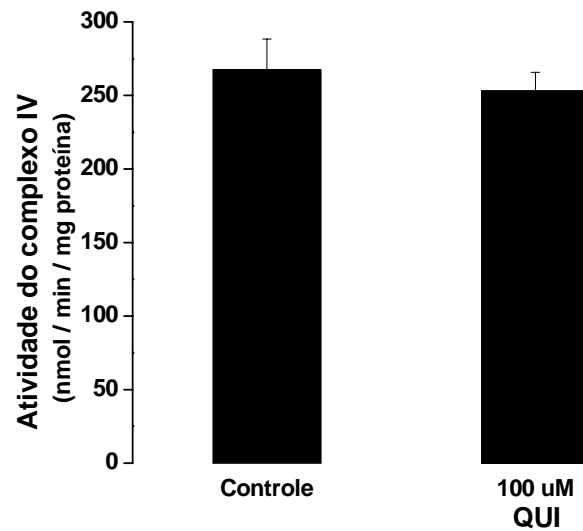


Figura IV.8. Efeito *in vitro* da L-quinurenina (QUI) sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em nmol de citocromo *c* oxidado/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados por teste *t* de Student para amostras pareadas. Não houve diferença significativa entre os grupos.

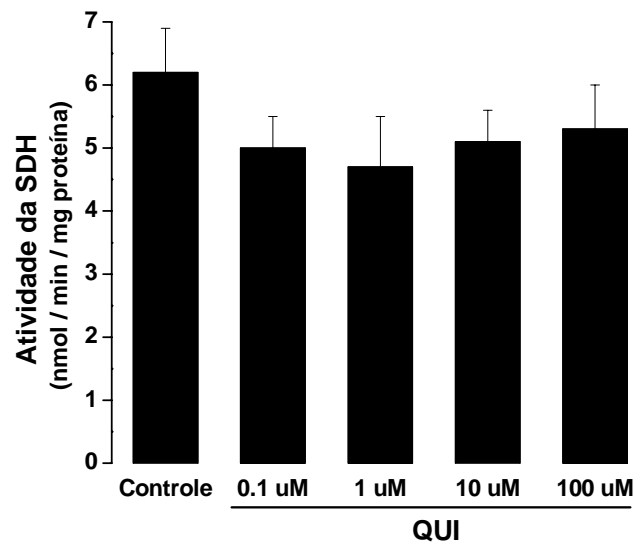


Figura IV.9 Efeito *in vitro* da L-quinurenia (QUI) sobre a atividade da SDH em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os resultados estão expressos em nmol de DCIP reduzido/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

IV. 1. 4 Efeito *in vitro* da L-quinurenina (QUI) sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura IV.10 mostra que a QUI não exerceu qualquer efeito significativo sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens [t(3)=0,373; p>0,05].

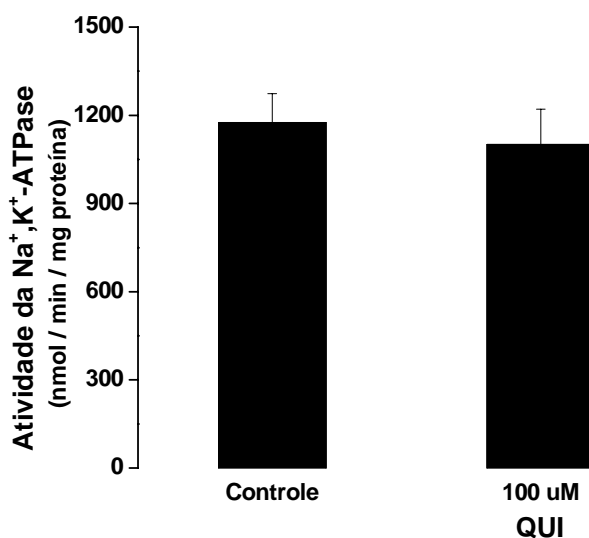


Figura IV.10 Efeito *in vitro* da L-quinurenia (QUI) sobre a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=4). Os dados estão expressos em nmol de Pi/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados pelo teste *t* de Student para amostras pareadas. Não houve diferença significativa entre os grupos.

IV. 2 Efeito *in vitro* do ácido quinurênico sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.

IV. 2. 1 Efeito *in vitro* do ácido quinurênico (AK) sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura IV.11 mostra que o ácido quinurênico aumentou significativamente a captação de glicose por fatias de córtex cerebral de ratos jovens a partir da concentração de 10 μM [$F(4,20)=3,15$; $p<0,05$].

IV. 2. 2 Efeito *in vitro* do ácido quinurênico (AK) sobre a produção de CO_2 a partir de glicose, acetato e citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura IV.12 mostra que o AK diminuiu significativamente a produção de CO_2 a partir de glicose [$F(4,25)=22,4$; $p<0,001$] em todas as concentrações testadas e de forma dose-dependente ($\beta=-0,66$; $p<0,001$). A figura IV.13 mostra que o AK inibiu significativamente a produção de CO_2 a partir de acetato [$F(4,20)=5,44$; $p<0,05$] nas concentrações de 1 μM e superiores. Já a figura IV.14 mostra que o AK inibiu significativamente a produção de CO_2 a partir de citrato [$F(4,25)=7,06$; $p<0,01$] nas concentrações de 1 μM e superiores, também de forma dose-dependente ($\beta=-0,56$; $p<0,001$).

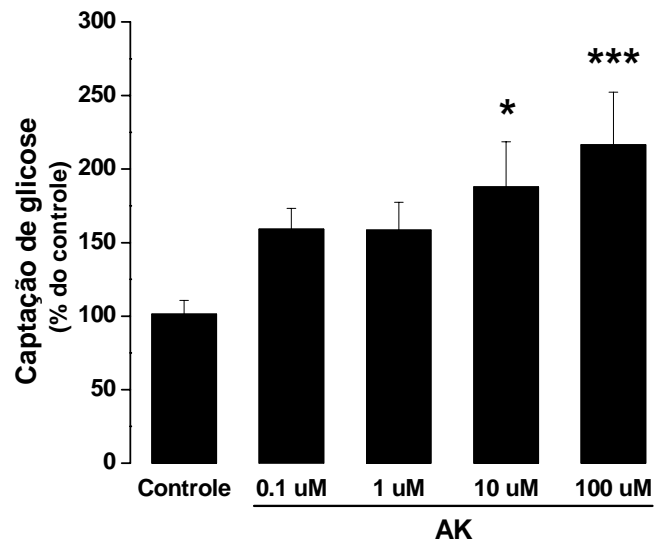


Figura IV.11 Efeito *in vitro* do ácido quinurênico (AK) sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=5) e estão expressos como porcentagem dos controles (média dos controles: $345,2 \pm 68,28$ μmol de glicose/h/g tecido). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle).

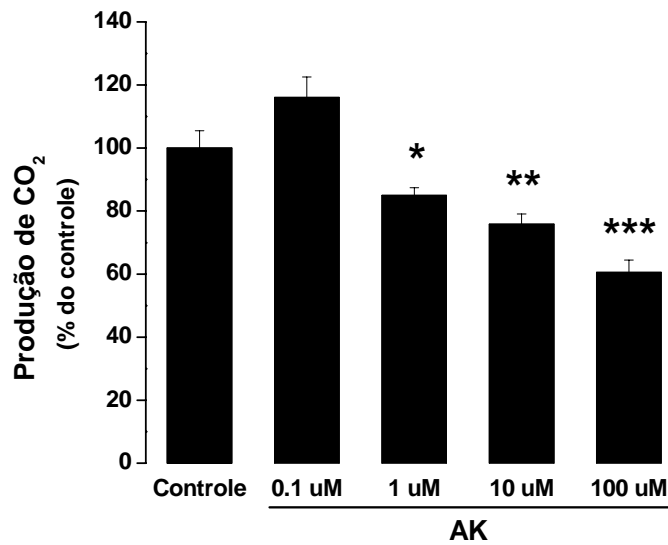


Figura IV.12 Efeito *in vitro* do ácido quinurênico (AK) sobre a produção de CO₂ a partir de glicose em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em porcentagem do controle (média dos controles: $3316,8 \pm 185,36$ nmol de glicose convertidos a CO₂/h/g de tecido). A diferença entre os grupos foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 em relação ao controle).

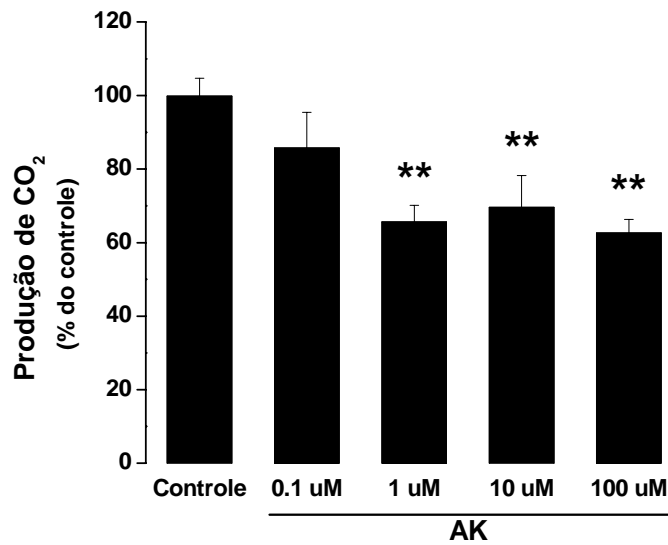


Figura IV. 13 Efeito *in vitro* do ácido quinurênico (AK) sobre a produção de CO₂ a partir de acetato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=5). Os dados estão expressos em porcentagem do controle (média dos controles: $136,8 \pm 6,74$ nmol de acetato convertidos a CO₂/h/g de tecido). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (**p<0,01 em relação ao controle).

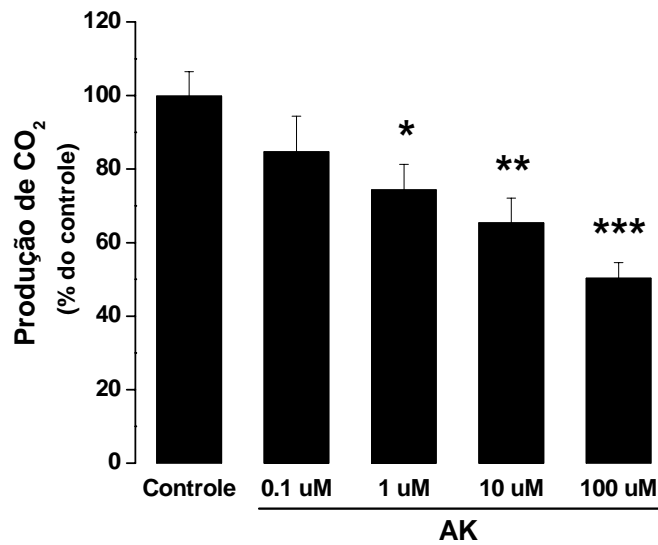


Figura IV.14 Efeito *in vitro* do ácido quinurênico (AK) sobre a produção de CO₂ a partir de citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em porcentagem do controle (média dos controles: $153,1 \pm 10,34$ nmol de citrato convertidos a CO₂/h/g de tecido). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 em relação ao controle).

IV. 2. 3 Efeito *in vitro* do ácido quinurênico sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos jovens.

IV. 2. 3. 1 Efeito *in vitro* do ácido quinurênico (AK) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura IV.15 mostra que o AK não exerceu qualquer efeito significativo sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens [$t(5)= 0,505$; $p>0,05$].

IV. 2. 3. 2 Efeito *in vitro* do ácido quinurênico (AK) sobre as atividades dos complexos I-III, II, II-III e IV da cadeia respiratória e da enzima succinato desidrogenase em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

O AK não exerceu qualquer efeito significativo sobre as atividades dos complexos I-III [$F(4,20)=1,846$; $p>0,05$] (figura IV.16), II [$F(4,20)=0,826$; $p>0,05$] (figura IV.17), II-III [$F(4,25)=0,764$; $p>0,05$] (figura IV.18) e IV [$t(5)=1,047$; $p>0,05$] (figura IV.19) da cadeia respiratória. Por outro lado, o AK inibiu significativamente a atividade da enzima succinato desidrogenase [$F(4,20)=5,546$; $p<0,01$] (figura IV.20) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens de forma dose-dependente ($\beta=-0,63$; $p<0,001$).

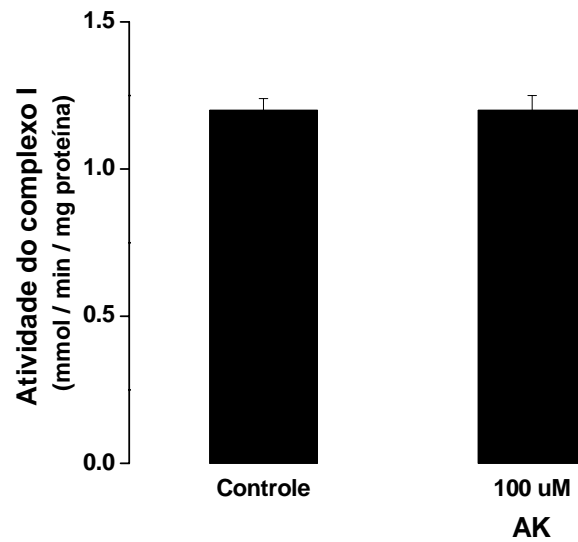


Figura IV.15 Efeito *in vitro* do ácido quinurênico (AK) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em mmol de ferricianeto reduzido/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados pelo teste *t* de Student para amostras pareadas. Não houve diferença significativa entre os grupos.

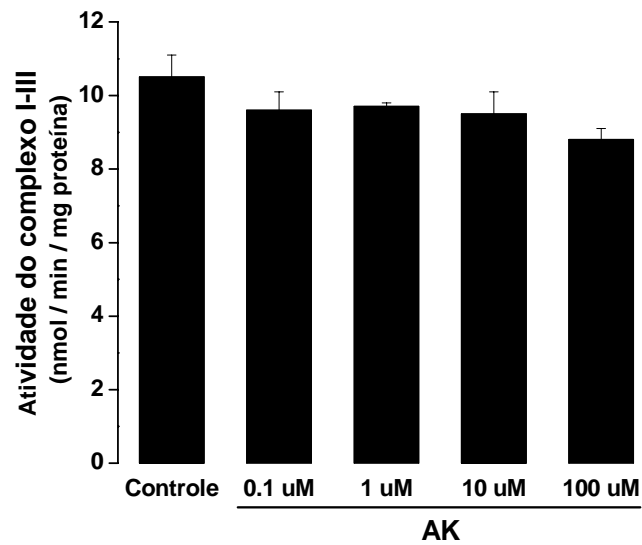


Figura IV.16 Efeito *in vitro* do ácido quinurênico (AK) sobre a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=5). Os dados estão expressos em nmol de citocromo c reduzido/min/mg proteína. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

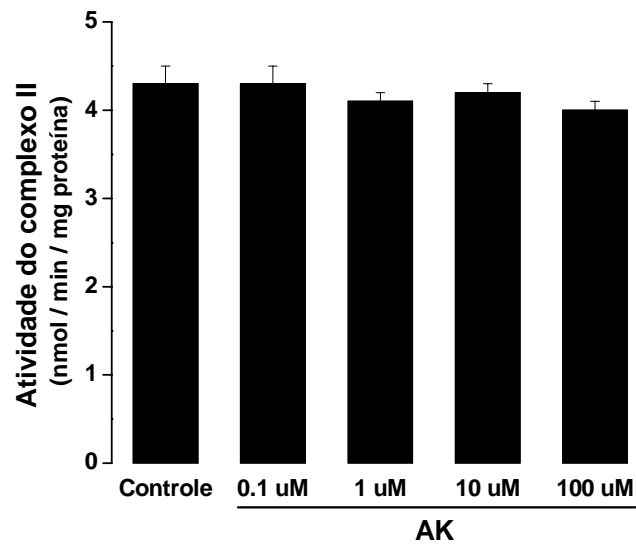


Figura IV.17 Efeito *in vitro* do ácido quinurênico (AK) sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=5). Os dados estão expressos em nmol de DCIP reduzido/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

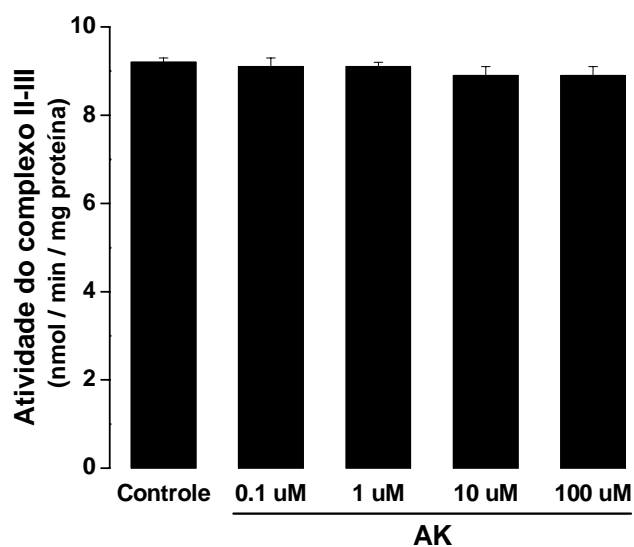


Figura IV.18 Efeito *in vitro* do ácido quinurênico (AK) sobre a atividade do complexo II-III da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em nmol de citocromo *c* reduzido/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

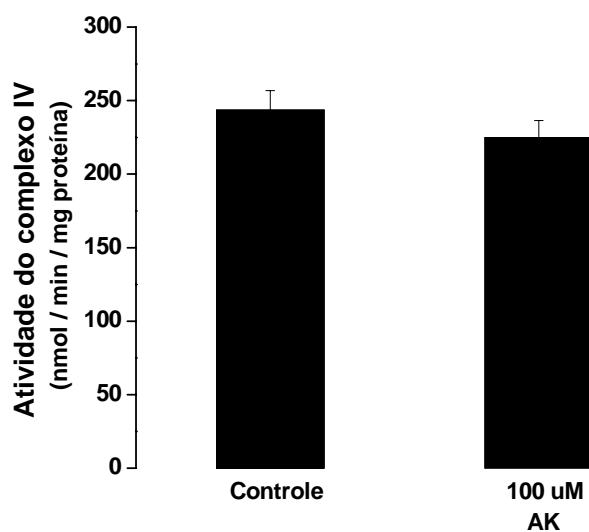


Figura IV.19 Efeito *in vitro* do ácido quinurênico (AK) sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em nmol de citocromo c oxidado/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados pelo teste *t* de Student para amostras pareadas. Não houve diferença significativa entre os grupos.

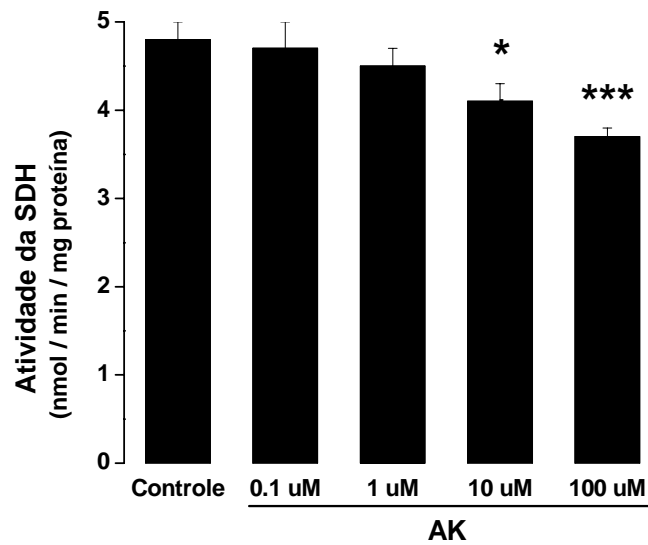


Figura IV.20 Efeito *in vitro* do ácido quinurênico (AK) sobre a atividade da SDH em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=5). Os resultados estão expressos em nmol de DCIP reduzido/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguidos pelo teste de Duncan (*p<0,05; ***p<0,001).

IV. 2. 4 Efeito *in vitro* do ácido quinurênico (AK) sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura IV.21 mostra que o AK não exerceu qualquer efeito significativo sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens [t(3)=0,477; p>0,05].

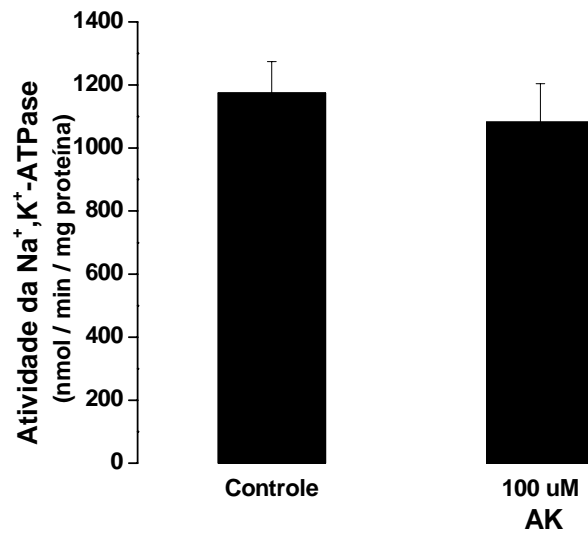


Figura IV.21 Efeito *in vitro* do ácido quinurênico (AK) sobre a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=4). Os dados estão expressos em nmol de Pi/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados pelo teste *t* de Student para amostras pareadas. Não houve diferença significativa entre os grupos.

IV. 3 Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.

IV. 3. 1 Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina (3HQ) sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura IV.22 mostra que a 3-hidroxiquinurenina aumentou a captação de glicose por fatias de córtex cerebral de ratos jovens a partir da concentração de 1 μM [$F(3,16)=3,997$; $p<0,05$].

IV. 3. 2 Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina (3HQ) sobre a produção de CO_2 a partir de glicose, acetato e citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura IV.23 mostra que a 3HQ diminuiu significativamente a produção de CO_2 a partir de glicose [$F(3,20)=6,81$; $p<0,01$] nas concentrações de 1 μM e superiores. A figura IV.24 mostra uma inibição da produção de CO_2 a partir de acetato causada pela 3HQ [$F(4,25)=5,74$; $p<0,01$] a partir da concentração de 10 μM . Já a figura IV.25 mostra que a 3HQ inibiu significativamente a produção de CO_2 a partir de citrato [$F(4,20)=18,2$; $p<0,001$] em todas as concentrações testadas. Observamos que a inibição da produção de CO_2 a partir de citrato (até 60%) foi muito maior do que a partir de glicose e acetato, indicando que a inibição do ciclo do ácido cítrico ocorre a partir do citrato.

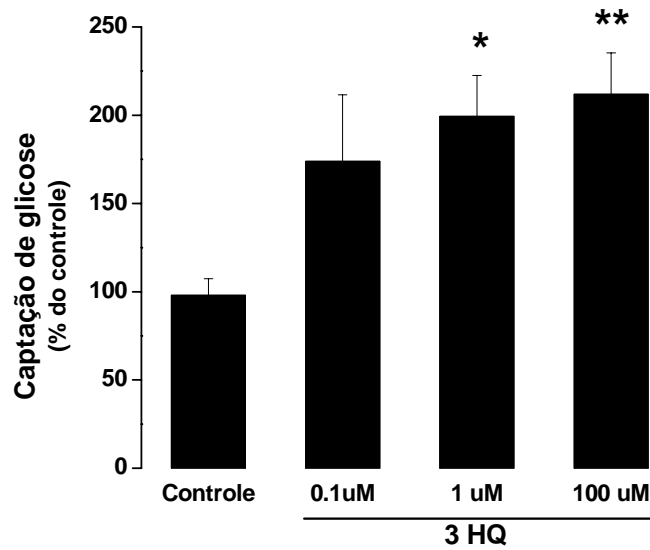


Figura IV.22 Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenia (3HQ) sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=5) e estão expressos como porcentagem dos controles (média dos controles: $376,4 \pm 20,89$ μmol de glicose/h/g tecido). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em relação ao controle).

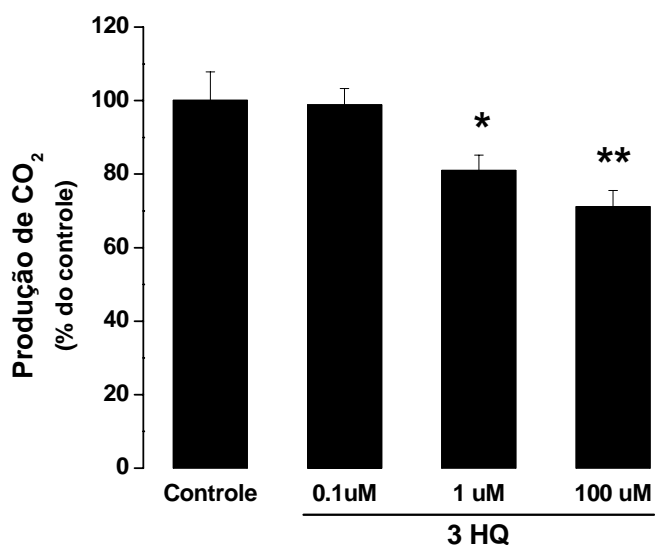


Figura IV.23 Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurena (3HQ) sobre a produção de CO₂ a partir de glicose em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em porcentagem do controle (média dos controles: $2179 \pm 166,66$ nmol de glicose convertidos a CO₂/h/g de tecido). A diferença entre os controles foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (*p<0,05; **p<0,01 em relação ao controle).

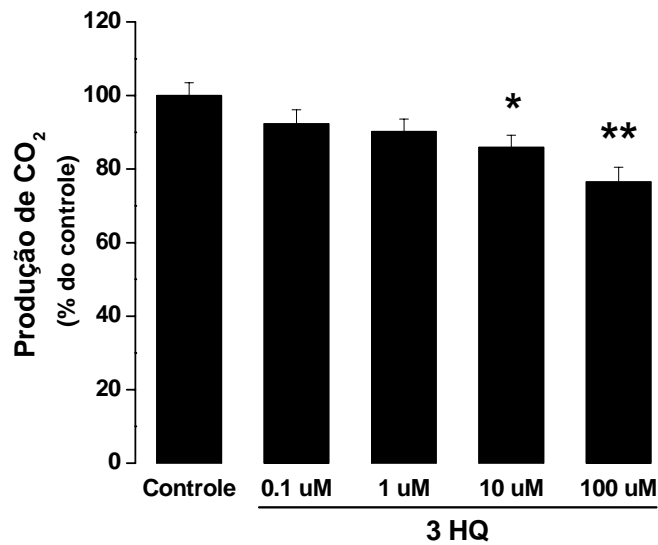


Figura IV.24 Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurena (3HQ) sobre a produção de CO₂ a partir de acetato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em percentagem do controle (média dos controles: $771,7 \pm 27,92$ nmol de acetato convertidos a CO₂/h/g de tecido). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (*p<0,05; **p<0,01 em relação ao controle).

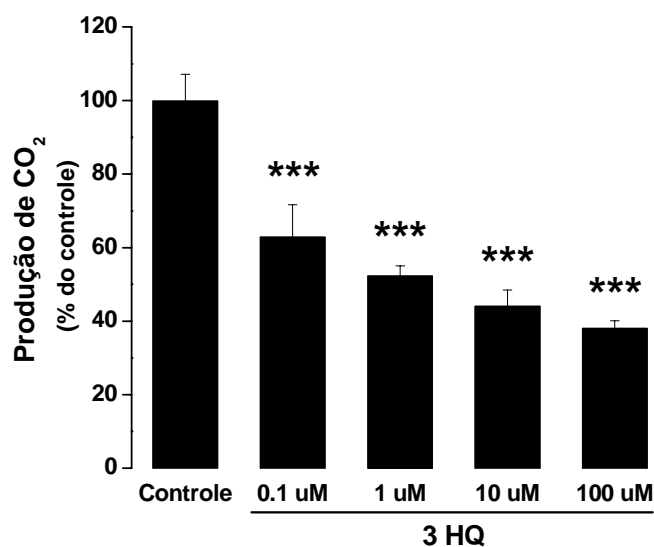


Figura IV.25 Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurena (3HQ) sobre a produção de CO₂ a partir de citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em percentagem do controle (média dos controles: $268,2 \pm 20,18$ nmol de citrato convertidos a CO₂/h/g de tecido). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (***) $p < 0,001$ em relação ao controle).

IV. 3. 3 Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos jovens.

IV. 3. 3. 1 Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina (3HQ) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura IV.26 mostra que a 3HQ inibiu significativamente a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens [$F(2,15)=18,9$; $p<0,001$] na concentração de 100 μM .

IV. 3. 3. 2 Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina (3HQ) sobre as atividades dos complexos II e IV da cadeia respiratória e da enzima succinato desidrogenase em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

A 3HQ inibiu significativamente as atividades dos complexos II [$F(4,20)=6,68$; $p<0,01$] (figura IV.27) e IV [$t(5)=1,01$; $p<0,05$] (figura IV.28) na concentração de 100 μM , sem exercer qualquer efeito sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase [$F(4,25)=1,10$; $p>0,05$] (figura IV.29) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens. Os complexos I-III e II-III não puderam ser avaliados devido ao fato da 3HQ interferir nas dosagens enzimáticas desses complexos, doando elétrons ao citocromo *c*.

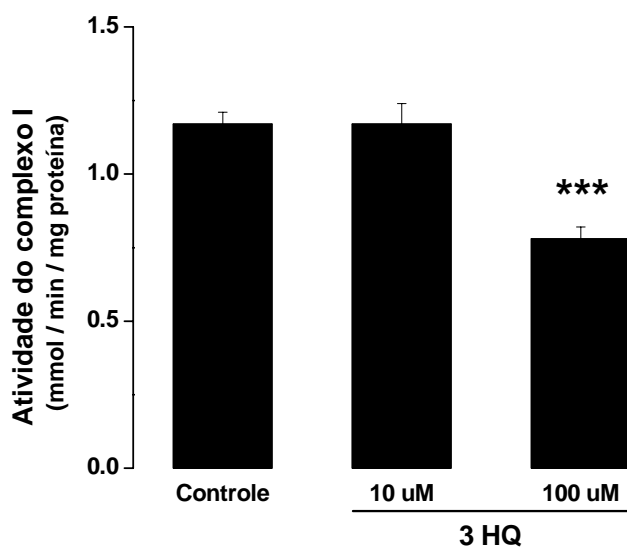


Figura IV.26 Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurena (3HQ) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em mmol de ferricianeto reduzido/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (**p<0,001 em relação ao controle).

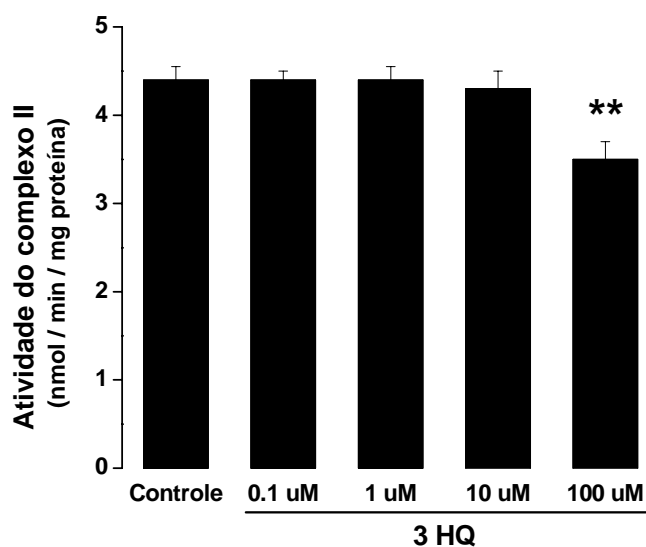


Figura IV.27 Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurena (3HQ) sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=5). Os dados estão expressos em nmol de DCIP reduzido/min/mg proteína. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (**p<0,01 em relação ao controle).

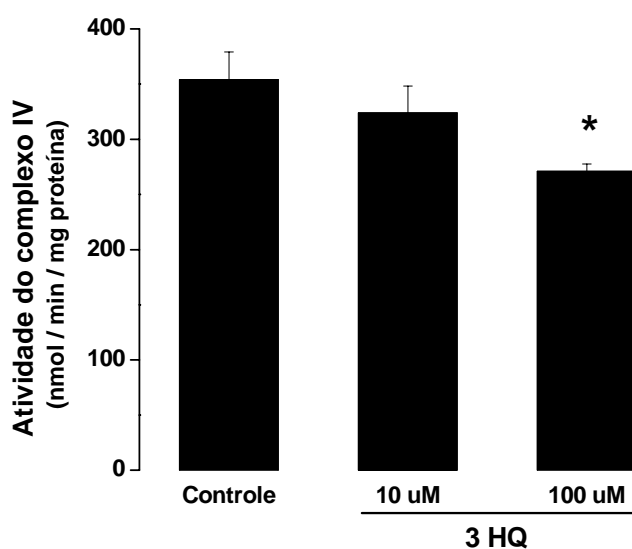


Figura IV.28 Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenia (3HQ) sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em nmol de citocromo c oxidado/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (* $p < 0,05$ em relação ao controle).

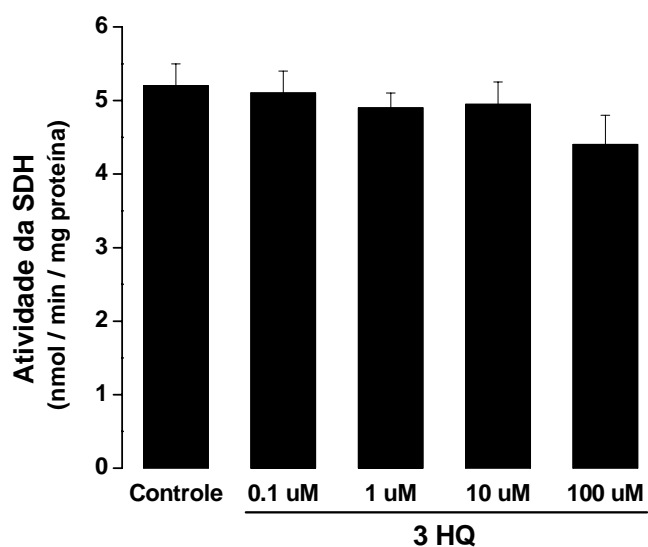


Figura IV.29 Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurena (3HQ) sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em nmol de DCIP reduzido/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

IV. 3. 4 Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurenina (3HQ) sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura IV.30 mostra que a 3HQ não exerceu qualquer efeito significativo sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens [t(3)=1,14; p>0,05].

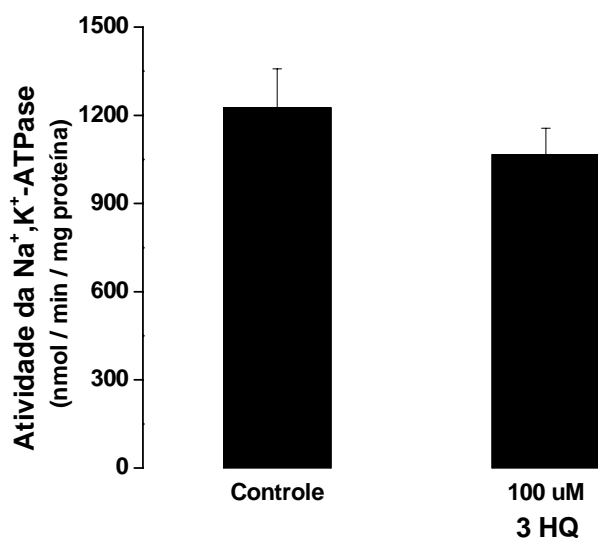


Figura IV.30 Efeito *in vitro* da 3-hidroxiquinurena (3HQ) sobre a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=4). Os dados estão expressos em nmol de Pi/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados pelo teste *t* de Student para amostras pareadas. Não houve diferença significativa entre os grupos.

IV. 4 Efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxi-antranílico sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.

IV. 4. 1 Efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura IV.31 mostra que o ácido 3-hidroxi-antranílico aumentou significativamente a captação de glicose por fatias de córtex cerebral de ratos jovens em todas as concentrações testadas [$F(4,25)=5,11$; $p<0,01$].

IV.4. 2 Efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a produção de CO₂ a partir de glicose, acetato e citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura IV.32 mostra que o 3HA diminuiu significativamente a produção de CO₂ a partir de glicose [$F(4,25)=16,8$; $p<0,001$] em todas as concentrações testadas de forma dose-dependente ($\beta=-0,679$; $p<0,001$). A figura IV.33 mostra a inibição da produção de CO₂ a partir de acetato causada pelo 3HA [$F(4,25)=4,62$; $p<0,01$] nas concentrações de 1 μM e superiores. Já a figura IV.34 mostra que o 3HA inibiu significativamente a produção de CO₂ a partir de citrato [$F(4,25)=7,17$; $p<0,01$] nas concentrações de 10 μM e superiores. Observamos que a inibição da produção de CO₂ a partir de citrato (até 60%) foi muito maior do que a partir de glicose e acetato, indicando que a inibição do ciclo do ácido cítrico ocorre a partir do citrato.

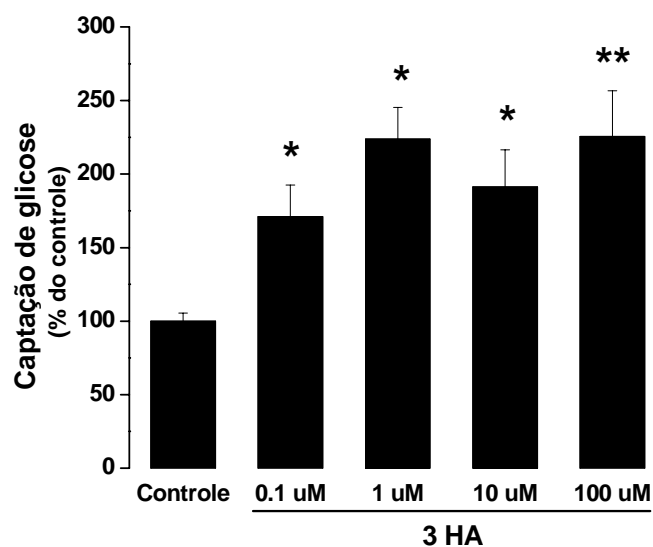


Figura IV.31 Efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6) e estão expressos como porcentagem dos controles (média dos controles: $274,5 \pm 13,59$ μmol de glicose/h/g tecido). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em relação ao controle).

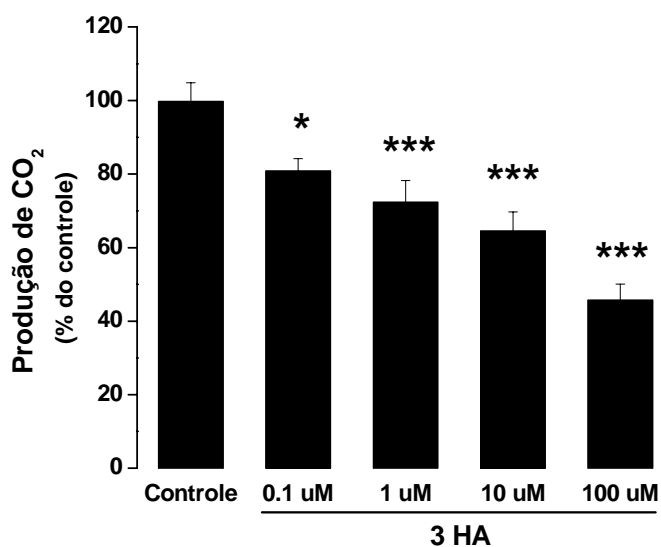


Figura IV.32 Efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a produção de CO₂ a partir de glicose em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em porcentagem do controle (média dos controles: $2599 \pm 131,76$ nmol de glicose convertidos a CO₂/h/g de tecido). A diferença entre os grupos foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (*p<0,05; ***p<0,001 em relação ao controle).

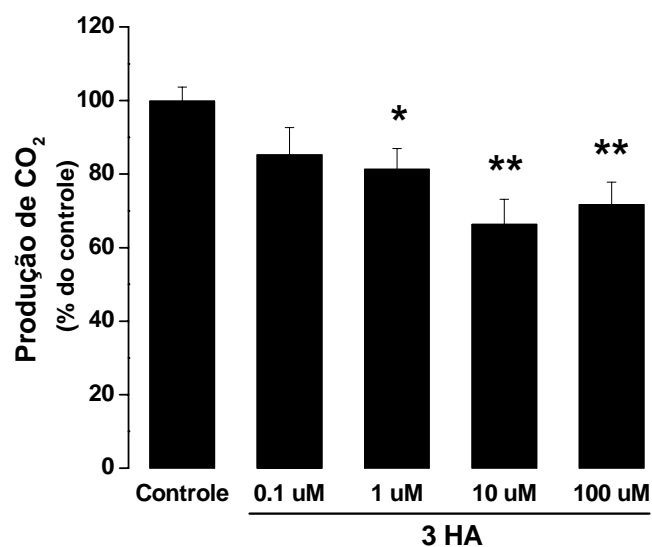


Figura IV.33 Efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a produção de CO₂ a partir de acetato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em porcentagem do controle (média dos controles: $237,3 \pm 24,55$ nmol de acetato convertidos a CO₂/h/g de tecido). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (*p<0,05; **p<0,01 em relação ao controle).

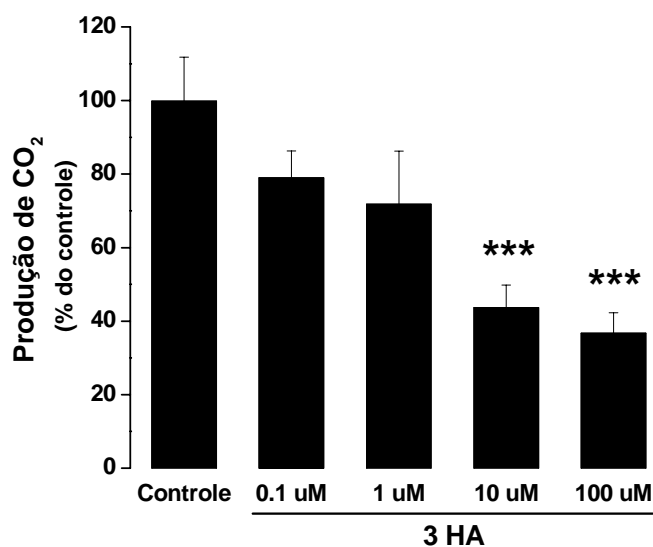


Figura IV.34 Efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a produção de CO₂ a partir de citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=5-6). Os dados estão expressos em porcentagem do controle (média dos controles: 196,9 nmol de citrato convertidos a CO₂/h/g de tecido). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (***)p<0,001 em relação ao controle).

IV. 4. 3 Efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxi-antranílico sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos jovens.

IV. 4. 3. 1 Efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura IV.35 mostra que o 3HA inibiu significativamente a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens [$F(2,15)=150,05$; $p<0,001$] na concentração de 100 μM .

IV. 4. 3. 2 Efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre as atividades dos complexos II e IV da cadeia respiratória e da enzima succinato desidrogenase em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

O 3HA inibiu significativamente a atividade do complexo II [$t(4,25)=3,19$; $p<0,05$] (figura IV.36) em todas as concentrações testadas, sem exercer efeito significativo sobre o complexo IV [$t(5)=2,28$; $p>0,05$] (figura IV.37). O 3HA também inibiu a atividade da enzima succinato desidrogenase [$F(4,25)=7,36$; $p<0,001$] (figura IV.38) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens. Podemos observar, no entanto, uma tendência à inibição do complexo IV na presença de 100 μM de 3HA. Os complexos I-III e II-III não puderam ser avaliados devido ao fato de o 3HA interferir no método de dosagem da atividade desses complexos, doando elétrons ao citocromo c.

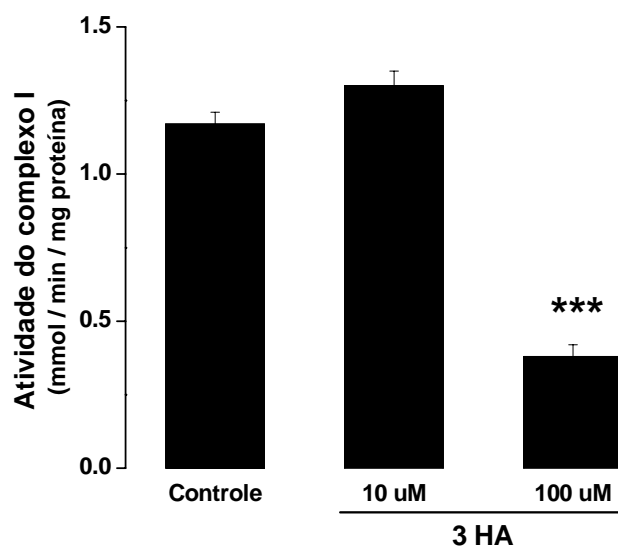


Figura IV.35 Efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em mmol de ferricianeto reduzido/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (**p<0,001 em relação ao controle).

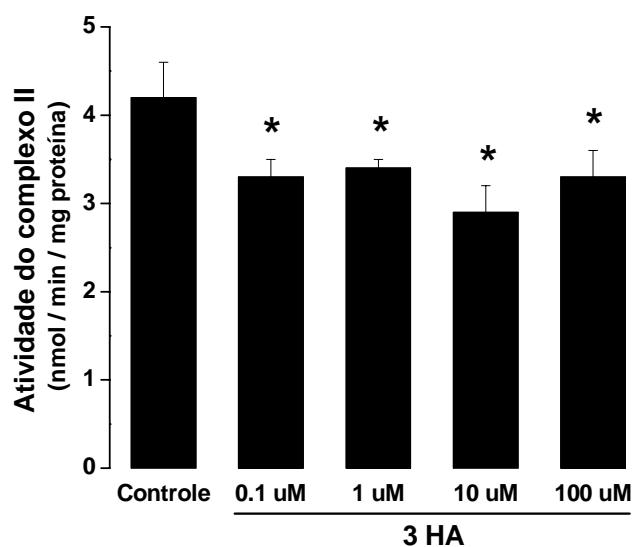


Figura IV.36 Efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em nmol de DCIP reduzido/min/mg proteína. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (* $p < 0,05$ em relação ao controle).

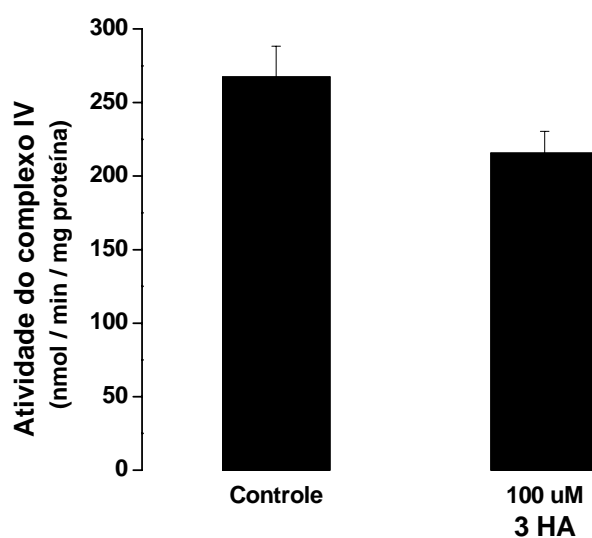


Figura IV.37 Efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em nmol de citocromo *c* oxidado/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados pelo teste *t* de Student para amostras pareadas. Não houve diferença significativa entre os grupos.

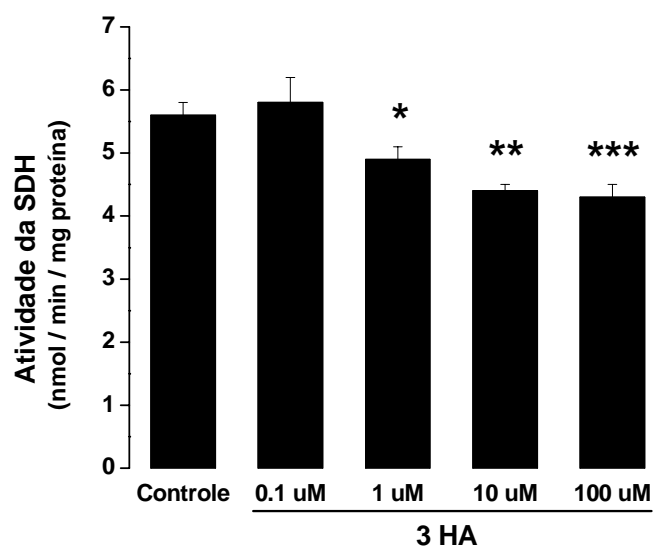


Figura IV.38 Efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em nmol de DCIP reduzido/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 em relação ao controle).

IV. 4. 4 Efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura IV.39 mostra que o 3HA não exerceu qualquer efeito significativo sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens [t(3)=0,782; p>0,05].

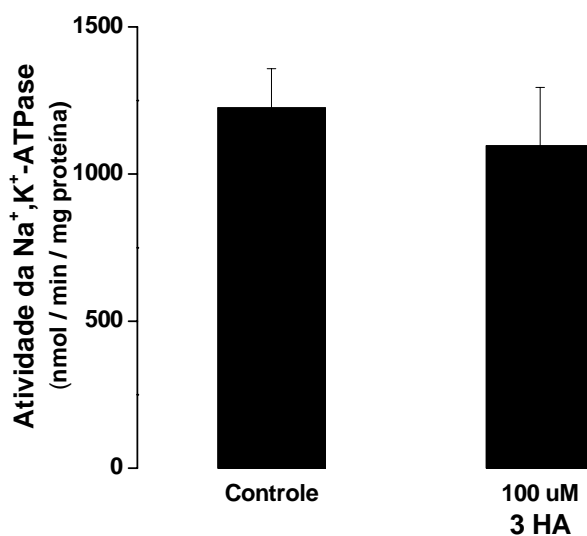


Figura IV.39 Efeito *in vitro* do ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) sobre a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média ± erro padrão (n=4). Os dados estão expressos em nmol de Pi/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados pelo teste *t* de Student para amostras pareadas. Não houve diferença significativa entre os grupos.

IV. 5 Efeito *in vitro* do ácido antranílico sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.

IV. 5. 1 Efeito *in vitro* do ácido antranílico (AA) sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura IV.40 mostra que o ácido antranílico aumentou a captação de glicose por fatias de córtex cerebral de ratos jovens em todas as concentrações testadas [F(4,25)=4,55; p<0,01].

IV. 5. 2 Efeito *in vitro* do ácido antranílico (AA) sobre a produção de CO₂ a partir de glicose, acetato e citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura IV.41 mostra que o AA diminuiu significativamente a produção de CO₂ a partir de glicose [F(4,25)=5,52; p<0,001] em todas as concentrações testadas. A figura IV.42 mostra uma inibição da produção de CO₂ a partir de acetato causada pelo AA [F(4,20)=2,95; p<0,05] nas concentrações de 10 e 100 µM. Já a figura IV.43 mostra que o AA inibiu significativamente a produção de CO₂ a partir de citrato [F(4,25)=5,01; p<0,01] nas concentrações de 1 µM e superiores.

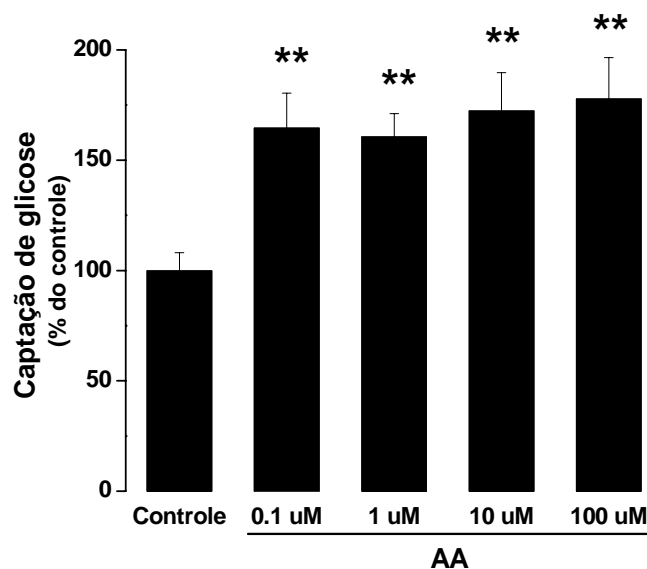


Figura IV.40 Efeito *in vitro* do ácido antranílico (AA) sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6) e estão expressos como porcentagem dos controles (média dos controles: $527,8 \pm 20,23$ μmol de glicose/h/g tecido). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (** $p < 0,01$ em relação ao controle).

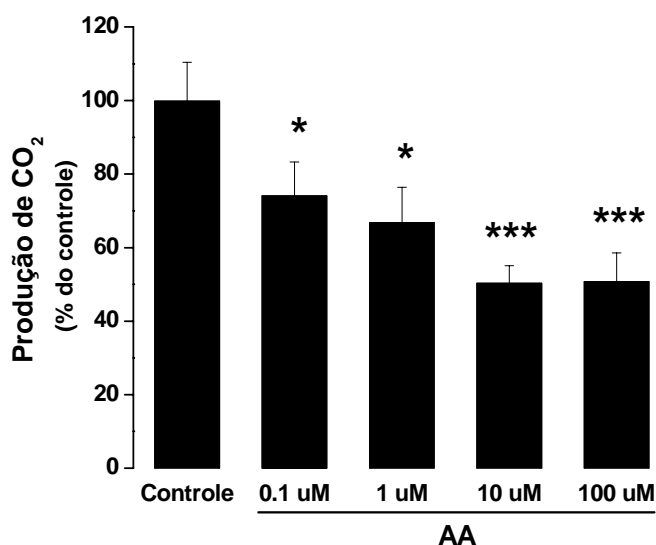


Figura IV.41 Efeito *in vitro* do ácido antranílico (AA) sobre a produção de CO₂ a partir de glicose em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em percentagem do controle (média dos controles: $6181,8 \pm 569,69$ nmol de glicose convertidos a CO₂/h/g de tecido). A diferença entre os controles foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (*p<0,05; ***p<0,001 em relação ao controle).

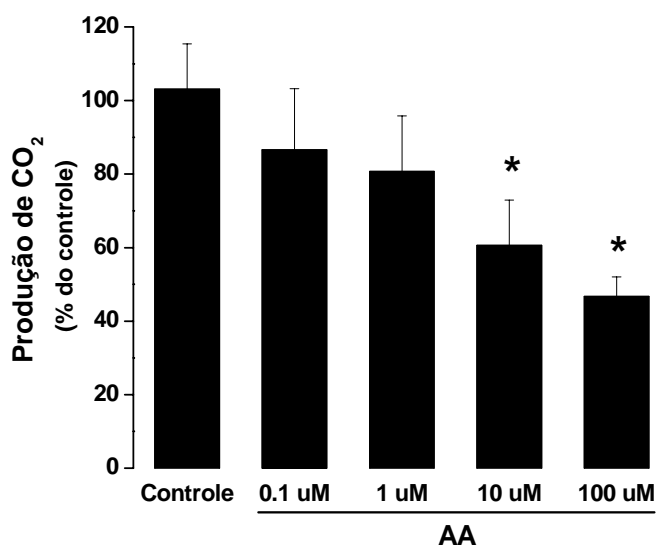


Figura IV.42 Efeito *in vitro* do ácido antranílico (AA) sobre a produção de CO₂ a partir de acetato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=5). Os dados estão expressos em porcentagem do controle (média dos controles: $335 \pm 16,78$ nmol de acetato convertidos a CO₂/h/g de tecido). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (*p<0,05 em relação ao controle).

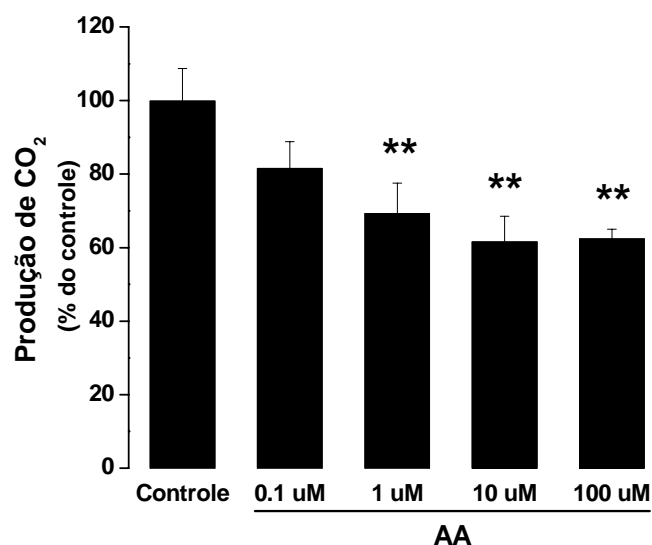


Figura IV.43 Efeito *in vitro* do ácido antranílico (AA) sobre a produção de CO₂ a partir de citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em percentagem do controle (média dos controles: $185,8 \pm 56,30$ nmol de citrato convertidos a CO₂/h/g de tecido). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (**p<0,01 em relação ao controle).

IV. 5. 3 Efeito *in vitro* do ácido antranílico sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos jovens.

IV. 5. 3. 1 Efeito *in vitro* do ácido antranílico (AA) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura IV.44 mostra que o AA não exerceu qualquer efeito significativo sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens [$t(3)=0,648$; $p>0,05$].

IV. 5. 3. 2 Efeito *in vitro* do ácido antranílico (AA) sobre as atividades dos complexos I-III, II, II-III e IV da cadeia respiratória e da enzima succinato desidrogenase em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

O AA inibiu significativamente a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória [$F(4,20)=3,90$; $p<0,05$] (figura IV.45), sem exercer qualquer efeito sobre os complexos II [$F(4,20)=0,459$; $p>0,05$] (figura IV.46), II-III [$F(4,15)=0,09$; $p>0,05$] (figura IV.47) e IV [$t(6)=1,63$; $p>0,05$] (figura IV.48) da cadeia respiratória. O AA também inibiu significativamente a atividade da enzima succinato desidrogenase [$F(4,20)=4,55$; $p<0,01$] (figura IV.49) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

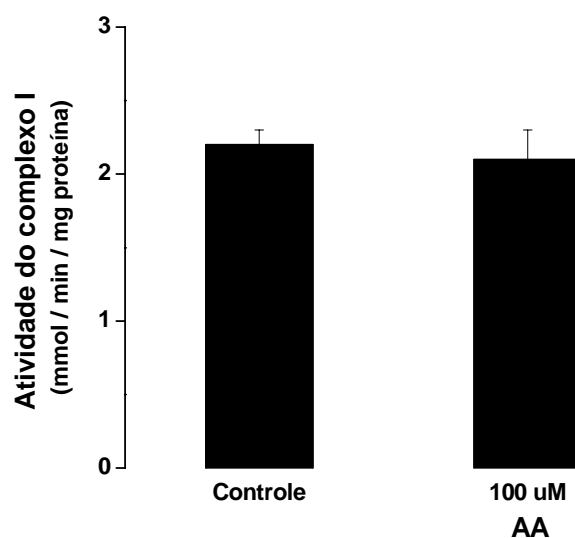


Figura IV.44 Efeito *in vitro* do ácido antranílico (AA) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=4). Os dados estão expressos em mmol de ferricianeto reduzido/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados pelo teste *t* de Student para amostras pareadas. Não houve diferença significativa entre os grupos.

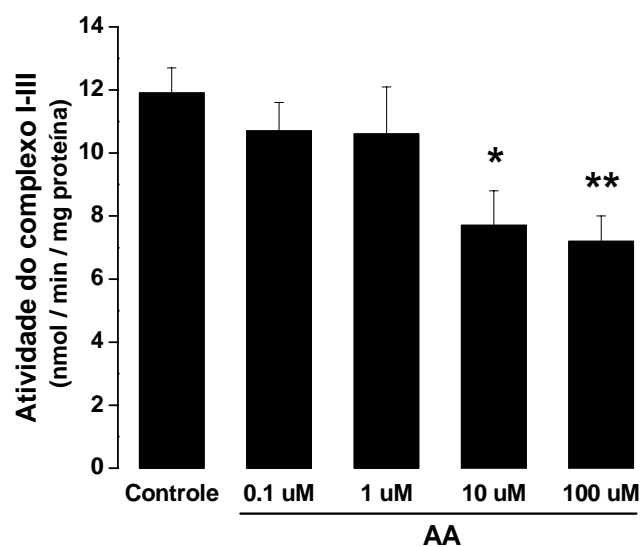


Figura IV.45 Efeito *in vitro* do ácido antranílico (AA) sobre a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=5). Os dados estão expressos em nmol de citocromo c reduzido/min/mg proteína. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (*p<0,05; **p<0,01 em relação ao controle).

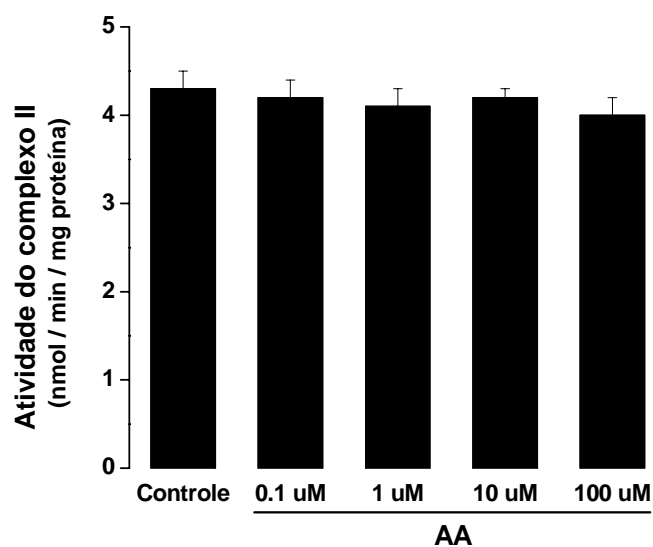


Figura IV.46 Efeito *in vitro* do ácido antranílico (AA) sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=5). Os dados estão expressos em nmol de DCIP reduzido/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

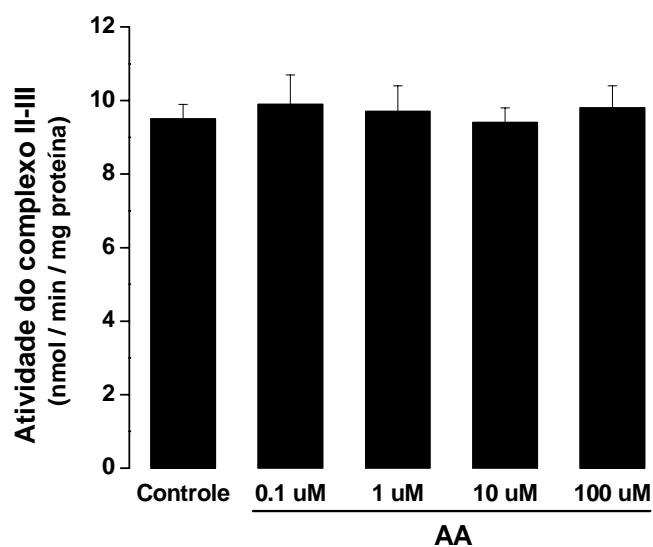


Figura IV.47 Efeito *in vitro* do ácido antranílico (AA) sobre a atividade do complexo II-III da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=4). Os dados estão expressos em nmol de citocromo *c* reduzido/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

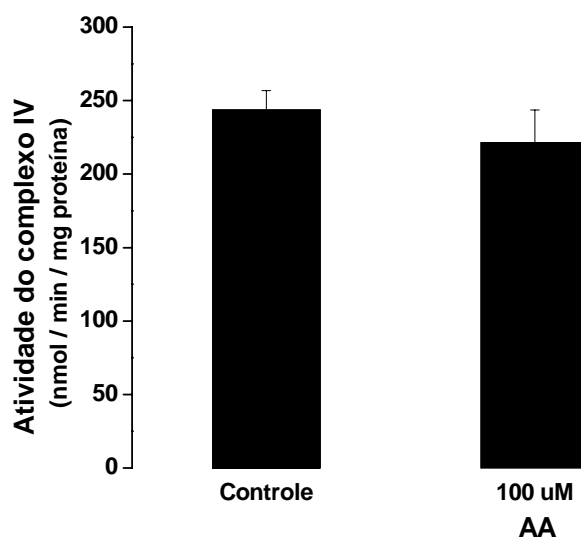


Figura IV.48 Efeito *in vitro* do ácido antranílico (AA) sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em nmol de citocromo c oxidado/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados pelo teste *t* de Student para amostras pareadas. Não houve diferença significativa entre os grupos.

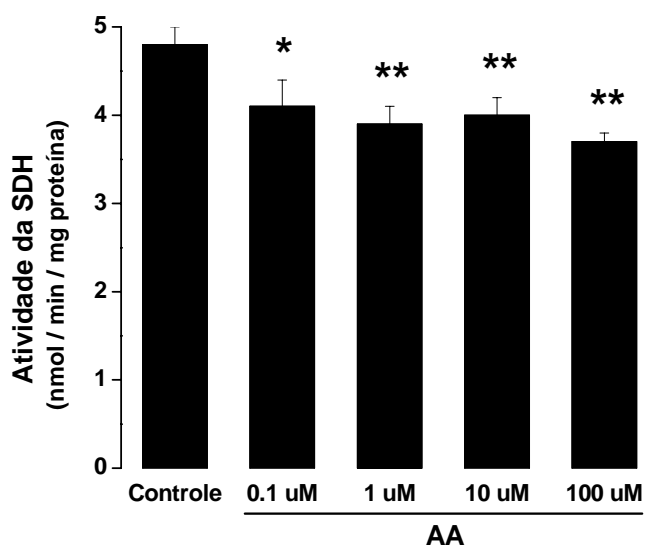


Figura IV.49 Efeito *in vitro* do ácido antranílico (AA) sobre a atividade da SDH em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=5). Os resultados estão expressos em nmol de DCIP reduzido/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (*p<0,05; **p<0,01 em relação ao controle).

IV. 5. 4 Efeito *in vitro* do ácido antranílico (AA) sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura IV.50 mostra que o AA não exerceu qualquer efeito significativo sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens [t(3)= 0,993; p>0,05].

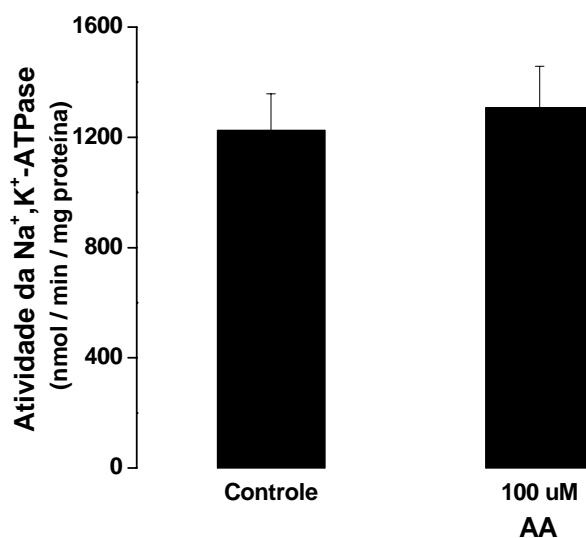


Figura IV.50 Efeito *in vitro* do ácido antranílico (AA) sobre a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=4). Os dados estão expressos em nmol de Pi/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados pelo teste *t* de Student para amostras pareadas. Não houve diferença significativa entre os grupos.

IV. 6 Efeito *in vitro* do ácido quinolínico sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.

IV. 6. 1 Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (AQ) sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura IV.51 mostra que o ácido quinolínico aumentou significativamente a captação de glicose por fatias de córtex cerebral de ratos jovens na concentração de 100 μM [$F(4,25)=3,41$; $p<0,05$].

IV. 6. 2 Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (AQ) sobre a produção de CO_2 a partir de glicose, acetato e citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura IV.52 mostra que o AQ diminuiu significativamente a produção de CO_2 a partir de glicose [$F(4,34)=3,81$; $p<0,05$] nas concentrações de 10 μM e superiores. As figuras IV.53 e IV.54 mostram uma inibição da produção de CO_2 a partir de acetato [$F(4,24)=3,80$; $p<0,05$] e citrato [$F(4,24)=42,6$; $p<0,001$], respectivamente, causada pelo AQ em todas as concentrações testadas. Observamos que a inibição da produção de CO_2 a partir de citrato (até 60%) foi muito maior do que a partir de glicose e acetato, indicando que a inibição do ciclo do ácido cítrico ocorre a partir do citrato.

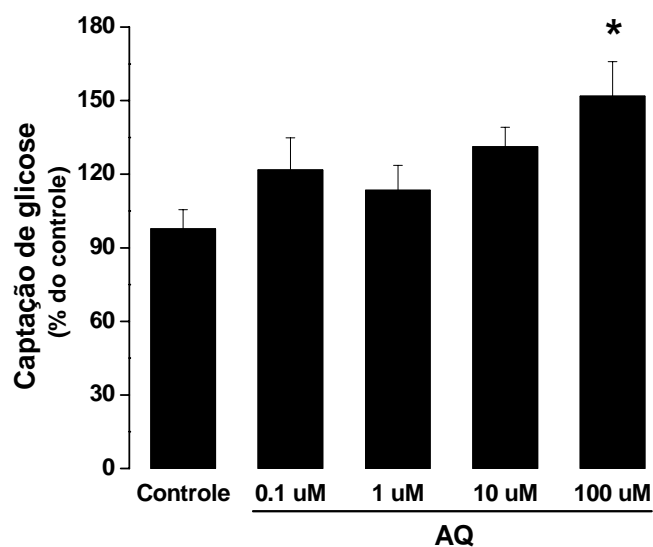


Figura IV.51 Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (AQ) sobre a captação de glicose em fatias de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão ($n=6$) e estão expressos como porcentagem dos controles (média dos controles: $562,4 \pm 19,09$ μmol de glicose/h/g tecido). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (* $p < 0,05$ em relação ao controle).

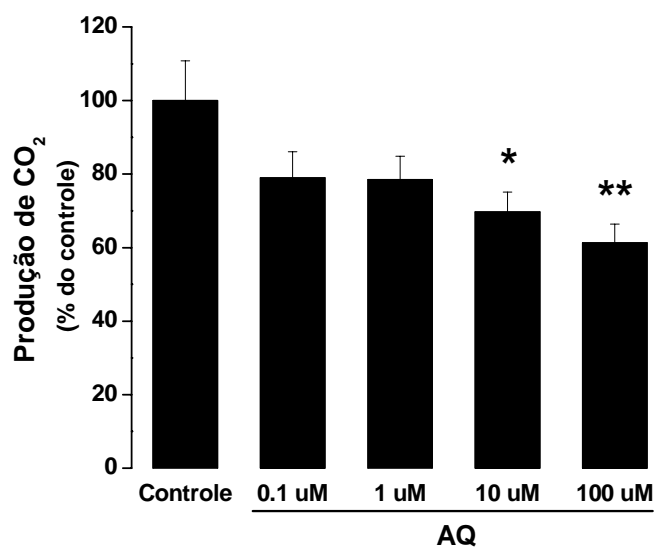


Figura IV.52 Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (AQ) sobre a produção de CO₂ a partir de glicose em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=8). Os dados estão expressos em porcentagem do controle (média dos controles: $3249,8 \pm 42,78$ nmol de glicose convertidos a CO₂/h/g de tecido). A diferença entre os grupos foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (*p<0,05; **p<0,01 em relação ao controle).

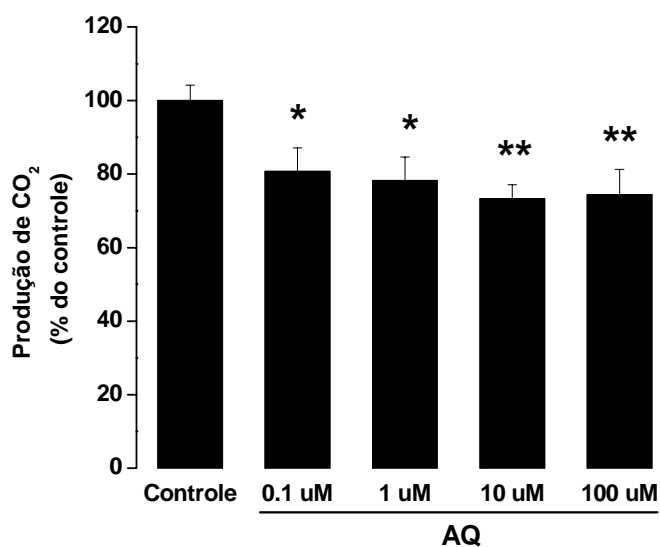


Figura IV.53 Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (AQ) sobre a produção de CO₂ a partir de acetato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=5-6). Os dados estão expressos em percentagem do controle (média dos controles: $417,4 \pm 12,53$ nmol de acetato convertidos a CO₂/h/g de tecido). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (*p<0,05; **p<0,01 em relação ao controle).

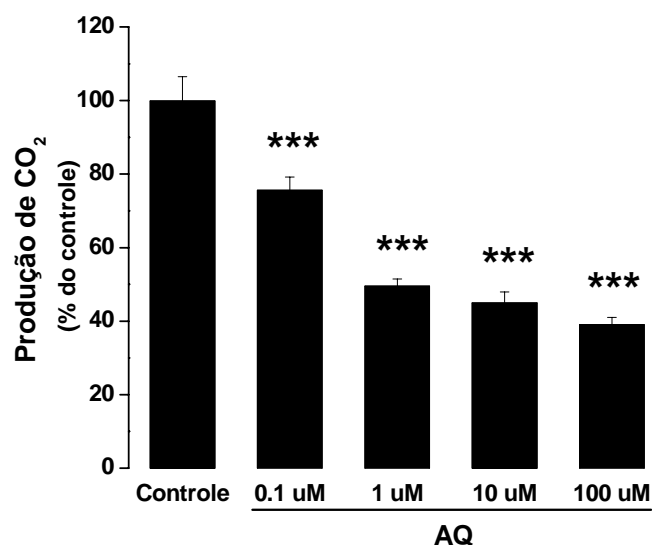


Figura IV.54 Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (AQ) sobre a produção de CO₂ a partir de citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=5-6). Os dados estão expressos em percentagem do controle (média dos controles: $410,9 \pm 27,06$ nmol de citrato convertidos a CO₂/h/g de tecido). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (***) $p < 0,001$ em relação ao controle).

IV. 6. 3 Efeito *in vitro* do ácido quinolínico sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos jovens.

IV. 6. 3. 1 Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (AQ) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura IV.55 mostra que o AQ não exerceu qualquer efeito significativo sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens [$t(3) = 0,388$; $p > 0,05$].

IV. 6. 3. 2 Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (AQ) sobre as atividades dos complexos I-III, II, II-III e IV da cadeia respiratória e da enzima succinato desidrogenase em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

O AQ inibiu significativamente a atividade do complexo II da cadeia respiratória [$F(4,35) = 2,89$; $p < 0,05$] (figura IV.57) na concentração de 100 μM , sem exercer efeito significativo sobre as atividades dos complexos I-III [$F(4,31) = 1,59$; $p > 0,05$] (figura IV.56), II-III [$F(4,24) = 0,18$; $p > 0,05$] (figura IV.58) e IV [$t(6) = 0,22$; $p > 0,05$] (figura IV.59) da cadeia respiratória, bem como sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase [$F(4,35) = 1,31$; $p > 0,05$] (figura IV.60) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

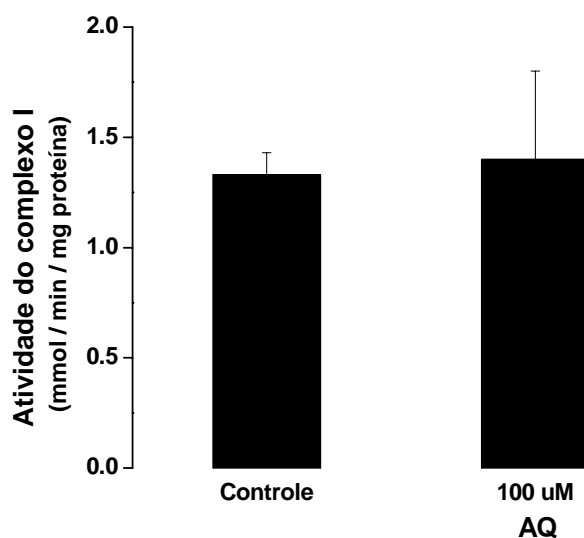


Figura IV.55 Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (AQ) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=4). Os dados estão expressos em mmol de ferricianeto reduzido/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados pelo teste *t* de Student para amostras pareadas. Não houve diferença significativa entre os grupos.

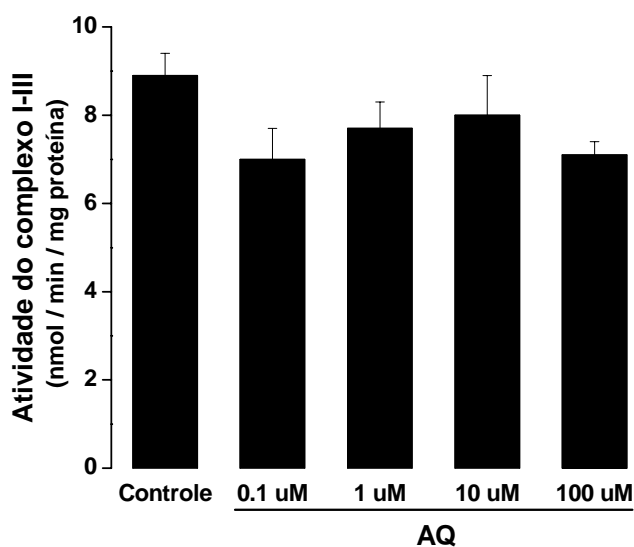


Figura IV.56 Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (AQ) sobre a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=7-8). Os dados estão expressos em nmol de citocromo c reduzido/min/mg proteína. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

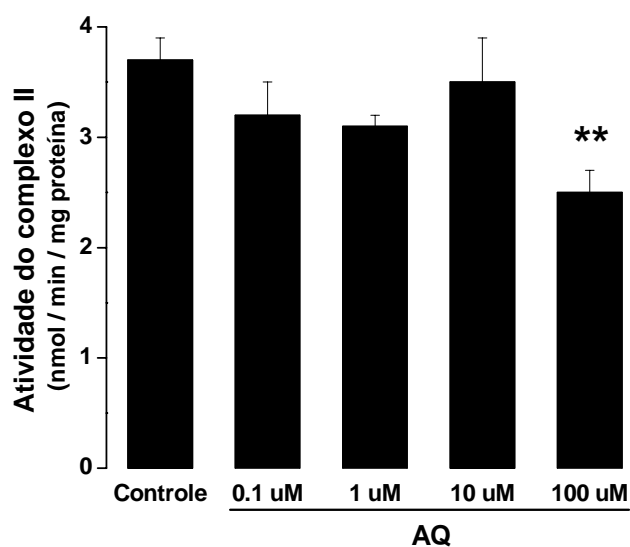


Figura IV.57 Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (AQ) sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=8). Os dados estão expressos em nmol de DCIP reduzido/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan (**p<0,01 em relação ao controle).

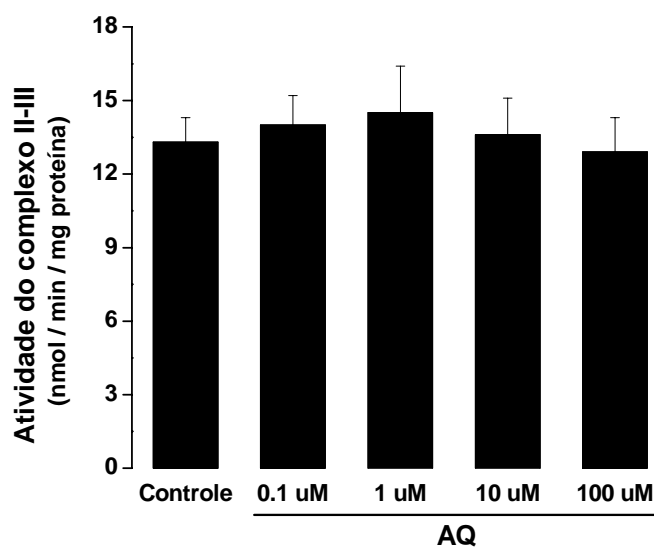


Figura IV.58 Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (AQ) sobre a atividade do complexo II-III da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=5-6). Os dados estão expressos em nmol de citocromo *c* reduzido/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

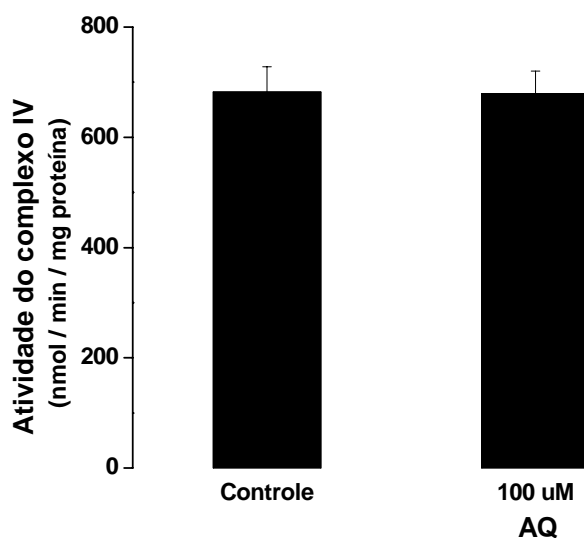


Figura IV.59 Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (AQ) sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=6). Os dados estão expressos em nmol de citocromo c oxidado/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados pelo teste *t* de Student para amostras pareadas. Não houve diferença significativa entre os grupos.

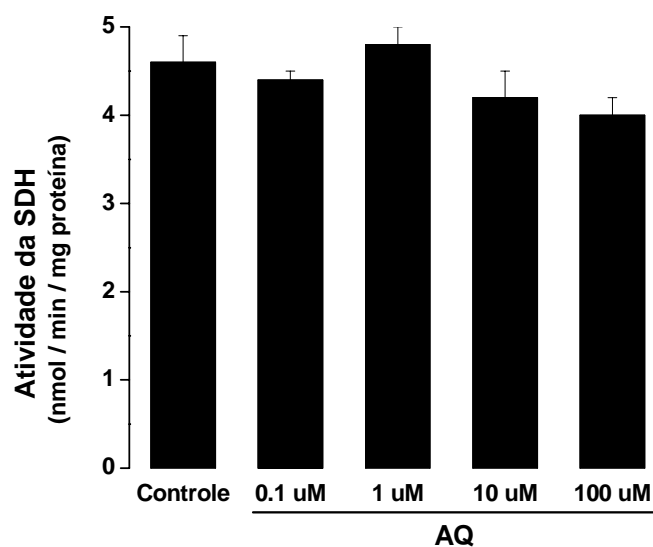


Figura IV.60 Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (AQ) sobre a atividade da SDH em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=8). Os resultados estão expressos em nmol de DCIP reduzido/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

IV. 6. 4 Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (AQ) sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura IV.61 mostra que o AQ não exerceu qualquer efeito significativo sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens [t(3)=0,25; p>0,05].

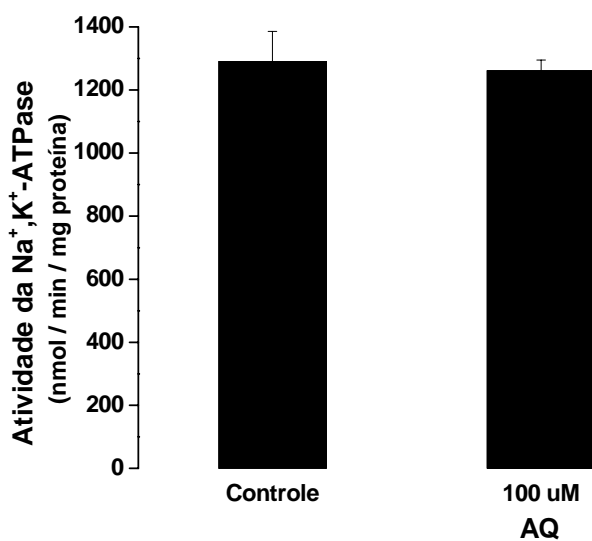


Figura IV.61 Efeito *in vitro* do ácido quinolínico (AQ) sobre a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm erro padrão (n=4). Os dados estão expressos em nmol de Pi/min/mg de proteína. Os resultados foram analisados pelo teste *t* de Student para amostras pareadas. Não houve diferença significativa entre os grupos.

V DISCUSSÃO

O catabolismo do triptofano através da via das quinureninas tem levantado bastante interesse nos últimos anos, visto que muitos dos intermediários dessa via apresentam importantes atividades biológicas. As quinureninas desempenham importante papel em determinadas funções fisiológicas, tais como no comportamento, sono, termo-regulação e na gestação, mas ainda pouco se sabe a respeito dos mecanismos de ação desses compostos (STONE, 1993; CURZON, 1996). No entanto, essas substâncias estão principalmente relacionadas à resposta imune, sendo capazes de induzir a expressão de várias citocinas, quimiocinas e seus receptores, promovendo a inflamação. (GUILLEMIN et al., 2000, 2001). No cérebro, são principalmente produzidas nas células da microglia, estando relacionadas à resposta inflamatória do SNC.

O ácido quinolínico (AQ) e o ácido quinurênico (AK) possuem atividades antagônicas, sendo o primeiro um agonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (STONE e PERKINS, 1981; SCHWARCZ et al., 1983; KIM e CHOI, 1987) e o segundo, um antagonista destes mesmos receptores (BIRCH et al., 1988), sugerindo que estes compostos desempenham um papel fisiológico importante na modulação da neurotransmissão glutamatérgica. Portanto alterações na rota das quinureninas podem potencialmente ocasionar aumento da síntese e/ou o decréscimo da síntese de um ou outro dos intermediários, levando a diferentes interações com os receptores glutamatérgicos e suas conseqüências. Nesse contexto, fármacos que atuem nessa via estão sendo desenvolvidos para o tratamento de diversas enfermidades do sistema nervoso central.

Por outro lado, os ácidos quinolínico e 3-hidroxi-antranílico bem como a 3-hidroxiquinurenina são compostos geradores de espécies reativas de oxigênio. Nesse particular, foi demonstrado que tanto o ácido 3-hidroxi-antranílico quanto a 3-

hidroxiquinurenina são capazes de reduzir a viabilidade celular (ESTMAN e GUILARTE, 1989; OKUDA et al., 1996,1998; CHIARUGI et al., 2001; LEE et al., 2004; JEONG et al., 2004), sendo que a morte das células ocorre por apoptose e possivelmente através da formação de espécies reativas de oxigênio provenientes da auto-oxidação desses compostos (OKUDA et al., 1998; CHIARUGI et al., 2001; CERSTIAENS et al., 2003; LEE et al., 2004).

No que se refere ao metabolismo energético, há poucos estudos sobre a influência das quinureninas sobre o mesmo. Entretanto, Bordelon e colaboradores (1997) demonstraram que o ácido quinolínico interfere no metabolismo energético mitocondrial após injeções intra-estriatais, diminuindo o consumo mitocondrial de oxigênio, os níveis de ATP e NAD^+ , bem como as concentrações de aspartato e glutamato. Recentemente, Baran e colaboradores (2001, 2003) demonstraram que algumas quinureninas alteram parâmetros respiratórios em mitocôndrias de coração de ratos. Esses investigadores demonstraram que o ácido quinurênico diminui a eficácia da síntese mitocondrial de ATP aumentando o estado IV da respiração e reduzindo o índice de controle respiratório e a razão ADP/oxigênio na presença de glutamato/malato. Também foi demonstrado que a 3-hidroxiquinurenina e o ácido 3-hidroxi-antranílico diminuem o índice de controle respiratório (razão do estado III/IV da respiração celular) e a razão ADP/oxigênio na presença de glutamato/malato e succinato. O ácido antranílico também foi capaz de interferir nos parâmetros respiratórios, diminuindo o estado III do consumo de oxigênio e diminuindo o índice de controle respiratório do consumo de glutamato/malato. Entretanto pouco se sabe de que modo essas substâncias interferem nesses parâmetros, bem como o efeito dessas sobre as várias etapas do metabolismo energético celular.

Recentemente, os metabólitos da via das quinureninas têm sido associados a várias doenças neurodegenerativas com comprometimento mitocondrial, tais como

as doenças de Huntington, Alzheimer, Parkinson, a demência associada à AIDS, a esclerose lateral amiotrófica e a acidemia glutárica tipo I, apesar de não se conhecer o papel exato das quinureninas na fisiopatologia dessas enfermidades.

Portanto, tendo em vista o conhecimento exíguo do efeito das quinureninas sobre o metabolismo energético cerebral, e considerando que as concentrações cerebrais de algumas quinureninas estão alteradas em doenças neurodegenerativas e que a disfunção mitocondrial é uma importante característica dessas doenças, sugerindo um déficit na produção de energia pelos pacientes, este trabalho teve por objetivo investigar os efeitos *in vitro* de algumas quinureninas, particularmente a L-quinurenina, o ácido quinurênico, a 3-hidroxiquinurenina, o ácido 3-hidroxi-antranílico, o ácido antranílico e o ácido quinolínico sobre importantes parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.

Verificamos inicialmente que todos os metabólitos, à exceção da L-quinurenina, aumentaram a captação de glicose por fatias de córtex cerebral de ratos jovens, bem como inibiram a produção de CO₂ a partir de glicose, acetato e citrato. O efeito destes compostos sobre a produção de CO₂ foi semelhante, ou seja, mesmo nas concentrações mais baixas utilizadas todas as substâncias testadas, com exceção da L-quinurenina, foram capazes de diminuir significativamente essa produção. Além disso, verificamos que a redução mais significativa da formação de CO₂ ocorreu a partir de citrato, indicando que um provável bloqueio do ciclo do ácido cítrico ocorreu em um passo adiante ao da formação de citrato. Por outro lado, nossos ensaios não afastam a possibilidade de que essas quinureninas possam se ligar à coenzima A (CoA), seqüestrando este composto que é essencial para a metabolização de glicose e acetato até CO₂. No entanto é pouco provável que isto tenha ocorrido, visto que a oxidação de citrato não necessita de CoA e também foi inibida pelos metabólitos. Não se pode também descartar uma inibição primária da

cadeia respiratória com inibição secundária do ciclo de Krebs por aumento da relação NADH/NAD^+ , situação em que as enzimas isocitrato desidrogenase, α -cetoglutarato desidrogenase e succinato desidrogenase seriam inibidas.

Já o aumento da captação de glicose pode refletir um aumento na utilização de glicose pelo tecido, provavelmente devido à tentativa de suprir a demanda energética através de um aumento na atividade da glicólise anaeróbica. Infelizmente, não medimos a produção de lactato pelo córtex cerebral na presença desses compostos. Este aumento da captação ocorreu mesmo em baixas concentrações (0,1 e 1 μM) de 3-hidroxiquinurenina e dos ácidos 3-hidroxi-antranílico e antranílico, sendo que este último provocou o maior aumento na captação de glicose (aproximadamente 177%). Já os ácidos quinurênico e quinolínico só foram capazes de estimular a captação de glicose pelo tecido cerebral em concentrações mais altas (10 e 100 μM , respectivamente), sendo que o ácido quinolínico exerceu o menor efeito sobre este parâmetro (aproximadamente 52%).

Investigamos, então, o efeito das quinureninas sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória. A L-quinurenina também não exerceu nenhum efeito significativo sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória, enquanto o ácido quinurênico inibiu significativamente apenas a atividade da enzima succinato desidrogenase (até cerca de 24%) nas concentrações de 10 μM e superiores, o que poderia explicar, ao menos em parte, a inibição da produção de CO_2 causada por tal composto. Entretanto, apesar dessa enzima ser parte integrante do complexo II da cadeia respiratória, o ácido quinurênico não foi capaz de alterar a atividade deste complexo. Não se pode desconsiderar o fato de que são utilizados aceptores artificiais de elétrons na medida dessas atividades enzimáticas e de que a medida da atividade da succinato desidrogenase é feita com o acceptor fenazina, não se podendo, portanto, descartar uma interferência do ácido quinurênico sobre a

captação de elétrons pela fenazina. Da mesma forma que o ácido quinurênico, o ácido antranílico também inibiu a atividade da SDH (aproximadamente 24%), sem interferir na atividade do complexo II da cadeia respiratória. Este composto também foi capaz de inibir o complexo I-III da cadeia transportadora de elétrons (cerca de 40%, em concentrações de 10 μM e superiores), corroborando os achados de Baran e colaboradores (2003), que encontraram alterações nos parâmetros respiratórios na presença de glutamato/malato ocasionadas pelo ácido antranílico. O ácido quinolínico inibiu o complexo II da cadeia respiratória apenas na concentração de 100 μM (cerca de 32%), sem inibir a atividade da succinato desidrogenase. Uma inibição apenas do complexo II, sem alteração da atividade da SDH, sugere que a inibição ocorra ao nível das subunidades do complexo II ancoradas na membrana mitocondrial interna. O ácido 3-hidroxi-antranílico foi capaz de inibir a atividade dos complexos I (aproximadamente 67% na concentração de 100 μM) e II (cerca de 20%) da cadeia transportadora de elétrons, bem como a atividade da enzima SDH (até 24%) nas concentrações de 1 μM e superiores. Já a 3-hidroxiquinurenina inibiu os complexos I (aproximadamente 33%), II (em torno de 22%) e IV (cerca de 24%) da cadeia respiratória. Os complexos I-III e II-III da cadeia transportadora de elétrons não puderam ser avaliados na presença da 3-hidroxiquinurenina e do ácido 3-hidroxi-antranílico devido à interferência por parte desses compostos nos métodos das dosagens enzimáticas desses complexos, doando elétrons ao citocromo *c*. Esse fato está de acordo com Giles e colaboradores (2003) que demonstraram que esses compostos são bons doadores de elétrons e capazes de reduzir o citocromo *c* devido à presença de uma hidroxila e de um grupamento amino em posição *orto*.

A 3-hidroxiquinurenina e o ácido 3-hidroxi-antranílico foram os compostos que demonstraram efeitos mais contundentes sobre o metabolismo energético, o que poderia estar associado ao fato de serem geradores de espécies reativas de

oxigênio, que são capazes de reagir com proteínas modificando resíduos de lisina (STUTCHBURY e TRUSTCOTT, 1993), podendo resultar em alterações de algumas atividades enzimáticas importantes, tais como dos complexos da cadeia transportadora de elétrons, bem como do próprio ciclo do ácido cítrico.

Também avaliamos o efeito das quinureninas sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens, enzima importante para a manutenção do gradiente químico dos íons Na^+ e K^+ , mantendo assim a homeostasia celular. Nenhum dos compostos testados alterou significativamente a atividade dessa enzima. A manutenção do gradiente iônico transmembrana é efetuado pela enzima Na^+, K^+ -ATPase (LINGREL e KUNTZWEILER, 1994) e alterações nos mecanismos que mantêm o equilíbrio destes íons entre os meios intra e extracelulares podem causar graves conseqüências ao cérebro (ERECINSKA e SILVER, 1994). Nossos resultados não demonstraram inibição direta da Na^+, K^+ -ATPase pelas quinureninas. No entanto, devemos considerar que os ensaios *in vitro* para a medida dessa atividade são realizados na presença de um excesso de ATP. Portanto não podemos afastar a hipótese de que a falta de ATP, decorrente de uma diminuição no metabolismo energético, diminuiria a atividade dessa enzima *in vivo*.

O cérebro é altamente dependente de níveis constantes e elevados de energia na forma de ATP. Situações como hipóxia e hipoglicemia podem levar a um dano irreversível e até mesmo a morte neuronal pela incapacidade celular de manter um gradiente iônico dependente de bombas que utilizam energia para a sua atividade. A energia necessária para manutenção das funções cerebrais bem como do gradiente iônico é proveniente principalmente da glicólise e da fosforilação oxidativa que, em condições normais, atuam conjuntamente (SILVER, DEAS e ERECINSKA, 1997). A manutenção das atividades normais dos complexos da

cadeia respiratória é essencial para o funcionamento normal do cérebro. Assim, algumas doenças genéticas e outros distúrbios que inibam a fosforilação oxidativa geram um acúmulo de NADH que por sua vez inibe o ciclo de Krebs favorecendo a conversão de piruvato em lactato o qual se encontra aumentado no plasma dos indivíduos afetados por essas desordens (VOET e VOET, 1990; WALLACE, 1999; SCHAPIRA, 1995). Uma diminuição no metabolismo energético cerebral, principalmente da fosforilação oxidativa, tem sido verificada em várias doenças neurodegenerativas comuns (SCHAPIRA et al., 1990; SCHAPIRA, 1998). Atualmente, alterações na cadeia transportadora de elétrons têm sido consideradas o evento etiológico primário na maioria dessas doenças (PARKER, 1989; PARKER et al., 1990, 1994; SWERDLOW et al., 1996, 1997).

Considerando que alterações das concentrações de algumas quinureninas têm sido associadas a várias patologias neurodegenerativas, tais como as doenças de Huntington, Alzheimer, Parkinson, a demência associada à AIDS, a esclerose lateral amiotrófica e a acidemia glutárica tipo I, embora até o presente momento não se possam precisar as concentrações que essas substâncias atingiriam no cérebro dos afetados, poder-se-ia supor que bloqueio do ciclo do ácido cítrico e diminuição da atividade da cadeia respiratória ocasionados por essas substâncias colaborariam, ao menos em parte, para o déficit energético encontrado nessas doenças e, conseqüentemente, para o dano neurológico característico das mesmas.

VI CONCLUSÕES

- A L-quinurenina (QUI) não exerceu nenhum efeito significativo sobre a captação de glicose, a produção de CO₂, as atividades dos complexos da cadeia respiratória bem como sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase em córtex cerebral de ratos jovens nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 µM.
- O ácido quinurênico (AK) aumentou significativamente a captação de glicose por fatias de córtex cerebral de ratos jovens nas concentrações de 10 e 100 µM.
- O AK diminuiu significativamente a produção de CO₂ por homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens em todas as concentrações testadas a partir de glicose, nas concentrações de 1, 10 e 100 µM a partir de acetato e nas concentrações de 1 µM e superiores a partir de citrato.
- O AK, nas concentrações de 10 e 100 µM, inibiu significativamente a atividade da enzima succinato desidrogenase em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.
- A 3-hidroxiquinurenina (3HQ) aumentou significativamente a captação de glicose por fatias de córtex cerebral de ratos jovens nas concentrações de 1, 10 e 100 µM.
- A 3HQ diminuiu significativamente a produção de CO₂ por homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens nas concentrações de 1, 10 e 100 µM a partir de

glicose, nas concentrações 10 e 100 μM a partir de acetato e em todas as concentrações testadas a partir de citrato.

– A 3HQ, na concentração de 100 μM , inibiu a atividade dos complexos I, II e IV da cadeia respiratória em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

– O ácido 3-hidroxi-antranílico (3HA) aumentou significativamente a captação de glicose por fatias de córtex cerebral de ratos jovens nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 μM .

– O 3HA diminuiu significativamente a produção de CO_2 em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 μM a partir de glicose, nas concentrações 1, 10 e 100 μM a partir de acetato e em 10 e 100 μM a partir de citrato.

– O 3HA inibiu significativamente a atividade dos complexos I (na concentração de 100 μM) e II (nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 μM) da cadeia respiratória, bem como a atividade da enzima succinato desidrogenase (nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 μM) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

– O ácido antranílico (AA) aumentou significativamente a captação de glicose por fatias de córtex cerebral de ratos jovens nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 μM .

– O AA diminuiu significativamente a produção de CO_2 em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 μM a partir de

glicose, nas concentrações de 10 e 100 μM a partir de acetato e nas concentrações de 1, 10 e 100 μM a partir de citrato.

– O AA inibiu significativamente a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória nas concentrações de 10 e 100 μM , bem como a atividade da enzima succinato desidrogenase nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 μM em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

– O ácido quinolínico (AQ) aumentou significativamente a captação de glicose por fatias de córtex cerebral de ratos jovens na concentração de 100 μM .

– O AQ diminuiu significativamente a produção de CO_2 em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens nas concentrações de 10 e 100 μM a partir de glicose, nas concentrações 0,1, 1, 10 e 100 μM a partir de acetato e nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 μM a partir de citrato.

– O AQ inibiu significativamente a atividade do complexo II da cadeia respiratória na concentração de 100 μM em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

– A L-quinurenina, o ácido quinurênico, a 3-hidroxiquinurenina, o ácido 3-hidroxi-antranílico, o ácido antranílico e o ácido quinolínico não alteraram a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens na concentração de 100 μM .

– Nossos resultados, demonstrando uma inibição do ciclo do ácido cítrico e da cadeia transportadora de elétrons pelas quinureninas, sugerem que essas substâncias inibam o metabolismo energético cerebral, o que pode colaborar para o comprometimento cerebral dos pacientes afetados por doenças em que há alteração nas concentrações desses compostos.

VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELES, R. H.; FREY, P. A.; JENCKS, W. P. **Biochemistry**. London: Jones e Bartlett, p. 603-631, 1992.

ALBERTS, B.; BRAT, D.; LEWIS, J. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 3a ed. New York: Garland Publishing, 2002.

ALLEGRI, G.; COSTA, C. V. L.; BERTAZZO, A. et al. Enzyme activities of tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in various species of animals. **Il Farmaco**. v. 58, p. 829-836, 2003.

ALLEGRI, G.; DE ANTONI, A.; BACCICHETTI, F. et al. Incorporation of D,L-tryptophan-benzene ring-¹⁴C (U) and D,L-tryptophan-methylene-¹⁴C into the melanin of mouse Harding-Passey melanoma. **Gazz. Chim. Ital.** v. 102, p. 426-430, 1972.

BARAN, H.; STANIEK, K.; KEPPLINGER, B. et al. Kynurenic acid influences the respiratory parameters of rat heart mitochondria. **Pharmacology**. v. 62, p. 119-123, 2001.

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

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

BEAL, M. F.; KOWALL, N. W.; ELLISON, D. W. et al. 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. et al. 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. et al. 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. et al. Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. **J. Neurosci.** v. 11, p. 1649-1659, 1991.

BEAL, M. F.; HYMAN, B. T.; KOROSHETZ, W. Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases? **Trends Neurosci.** v. 16, p. 125-131, 1993.

BEAL, M. F. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative disease. **Ann. Neurol.** v. 38, p. 357-366, 1995.

BEHAN, W. M.; MCDONALD, M.; DARLINGTON, L. G. et al. 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.

BENASSI, C. A.; PERISSINOTTO, B.; ALLEGRI, G. The metabolism of tryptophan in patients with bladder cancer and other urological diseases. **Clin. Chim. Acta.** v. 8, p. 822-831, 1963.

BIRCH, P. J.; GROSSMAN, C. J.; Hayes, A. G. Kynurenic acid antagonises responses to NMDA via an action at the strychnine-insensitive glycine site. **Europ. J. Pharmacol.** v. 154, p. 85-87, 1988.

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

BOWLING, A. C.; BEAL, M. F. Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Life Sci.** v. 56, p. 1151-1171, 1995.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248-254, 1976.

BRENNAN, W. A.; BIRD, E. D.; APRILLE, J. R. Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain. **J. Neurochem.** v. 44, p. 1948-1950, 1985.

BRYAN, G. T. Urinary excretion of indoxyl sulphate (indican) by human subjects ingesting a semisynthetic diet containing variable quantities of L-tryptophan. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 19, p. 113-119, 1966.

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

BURNS, L. H.; PAKZABAN, P.; DEACON, T. W. et al. Selective putaminal excitotoxic lesions in non-human primates model the movement disorder of Huntington's disease. **Neuroscience**. v. 64, p. 1007-1017, 1995.

CARPENEDO, R.; CHARUGI, A.; RUSSI, P. et al. Inhibitors of kynurenine hydroxylase and kynureninase increase cerebral formation of kynurenic acid and have sedative and anticonvulsant activities. **Neuroscience**. v. 61, p. 237-244, 1994.

CASSINA, A.; RADI, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 328, p. 309-316, 1996.

CERSTIAENS, A.; HUYBRECHTS, J.; KONATEN, S. et al. Neurotoxic and neurobehavioral effects of kynurenines in adult insects. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** v. 312, p. 1171-1177, 2003.

CHAN, K.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -stimulated ATPase activity. **Anal. Biochem.** v. 157, p. 375-380, 1986.

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.

CLARK, J. B.; BATES, T. E.; CULLINGFORD, T. et al. Development of enzymes of energy metabolism in the neonatal mammalian brain. **Dev. Neurosci. Basel.** v. 17, p. 174-180, 1993.

CONNICK, J. H.; CARLA, V.; MORONI, F. et al. Increase in kynurenic acid in Huntington's disease motor cortex. **J. Neurochem.** v. 52, p. 958-987, 1989.

COSTA, C.; ALLEGRI, G.; DE ANTONI, A. Studies on melanogenesis of tryptophan in Harding-Passey mouse melanoma. **Acta Vitaminol. Enzymol.** v. 29, p. 223-226, 1975.

CREMER, J. E.; BRAUN, L. D.; OLDENDORF, W. H. Changes during development in transport process of the blood-brain barrier. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 448, p. 633-637, 1976.

CRONE, C. Facilitated transfer of glucose from blood into brain tissue. **J. Physiol.** v. 181, 103-106, 1965.

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

DAVIS, J. N.; HUNNICUTT, J. C. Jr.; CHISHLOM, A. A mitochondrial bottleneck hypothesis of Alzheimer's disease. **Mol. Med. Today**. v. 1, p. 240-247, 1995.

DE ANTONI, A.; ALLEGRI, G.; COSTA, C. et al. Melanogenesis from tryptophan. Biogenetic experiments with Harding-Passey mouse melanoma. **Experientia**. v. 30, p. 600-601, 1974.

DI DONATO, S. Disorders related to mitochondrial membranes: Pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. **J. Inher. Metab. Dis.** v. 23, p. 247-263, 2000.

DONALDSON, J.; ST-PIERRE, J.; MINICH, J. et al. Seizures in rats associated with divalent cation inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase. **Can. J. Biochem.** v. 49, p. 1217-1224, 1977.

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. Cytotoxicity of 3-hydroxykynurenine in a neuronal hybrid cell line. **Brain Res.** v. 495, p. 225-231, 1989.

EASTMAN, C. L.; GUILARTE, T. R. the role of hydrogen peroxide in the in vitro cytotoxicity of 3-hydroxykynurenine. **Neurochem. Res.** v. 15, p. 1101-1107, 1990.

ERECINSKA, M.; SILVER, I. A. Ions and energy in mammalian brain. **Prog. Neurobiol.** v. 43, p. 37-71, 1994.

FISCHER, J. C.; RUITENBEEK, W.; BERDEN, J. A. et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clin. Chim. Acta.** v. 153, p. 23-36, 1985.

FOSTER, A. C.; VEZZANI, A.; FRENCH, E. D. et al. Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. **Neurosci. Lett.** v. 48, p. 273-278, 1984.

GEERING, K. Subunit assembly and functional maturation of Na⁺, K⁺-ATPase. **J. Membrane Biol.** v. 155, p. 109-121, 1990.

GERMANO, I. M.; PITTS, L. H.; MELDRUM, B. S. et al. Kynurenate inhibition of cell excitation decreases stroke size and deficits. **Ann. Neurol.** v. 22, p. 730-734, 1987.

GIBSON, G. F.; SHEU, K. F. R.; BLASS, J. P. et al. Reduced activities of thiamine-dependent enzymes in the brains and peripheral tissues of patients with Alzheimer's disease. **Arch. Neurol.** v. 45, p. 836-840, 1988.

GILES, G. I.; COLLINS, C. A.; STONE, T. W. et al. Electrochemical and *in vitro* evaluation of redox-properties of kynurenine species. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 300, p. 719-724, 2003.

GILL, R.; WOODRUF, G. N. The neuroprotective actions of kynurenic acid and MK-801 in gerbils are synergistic and not related to hypothermia. **Eur. J. Pharmacol.** v. 176, p. 143-149, 1990.

GRAFTON, S. T.; MAZZIOTA, J. C.; PAHL, J. J. et al. Serial changes of cerebral glucose metabolism and caudate size in persons at risk for Huntington's disease. **Arch. Neurol.** v. 49, p. 1161-1167, 1992.

GU, M.; GASH, M. T.; MANN, V. M. et al. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. **Ann. Neurol.** v. 39, p. 385-389, 1996.

GU, M.; OWEN, A. D.; TOFFA, S. E. K. et al. Mitochondrial function, GSH and iron in neurodegenerative and Lewy body diseases. **J. Neurol. Sci.** v. 158, p. 24-29, 1998.

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

GUILLEMIN, G. J.; SMITH, D. G.; WILLIAMS, K. et al. β -Amyloid peptide 1-42 induces human macrophages to produce the neurotoxin quinolinic acid. **J. Neuroimmunol.** v. 118, p. 336, 2001b.

HANGLUND, M. M.; STHAL, W. L.; KUNKEL, D. D. et al. Developmental and regional differences in the localization of Na^+ , K^+ -ATPase activity in the rabbit hippocampus. **Brain Res.** v. 343, p. 198-203, 1985.

HAYAISHI, 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.

HAYDEN, M. R.; MARTIN, W. R. W.; STOESSL, A. J. et al. Positron emission tomography in the early diagnosis of Huntington's disease. **Neurology.** v. 36, p. 888-894, 1986.

HEYES, M. P.; SAITO, K.; CROWLEY, J. S. et al. Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurologic disease. **Brain.** v. 115, p. 1249-1273, 1992.

HEYES, M. P.; ACHIM, C. L.; WILEY, C. A. et al. Human microglia convert L-tryptophan into the neurotoxin quinolinic acid. **Biochem. J.** v. 320, p. 595-597, 1996.

HILMAS, C.; PEREIRA, E. F.; ALKONDON, M. et al. The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha 7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha 7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. **J. Neurosci.** v. 21, p. 7463-7473, 2001.

HITSCHKE, K.; BÜHLER, R.; APELL, H. J. et al. Inactivation of the Na⁺, K⁺-ATPase by radiation-induced free radical-chain mechanism. **FEBS Lett.** v. 353, p. 297-300, 1994.

JACOBSON, I. R.; HAGBERG, H.; SANDBERG, M. et al. Ouabain-induced changes in extracellular aspartate, glutamate and GABA levels in the rabbit olfactory bulb *in vivo*. **Neurosci. Lett.** v. 64, p. 211-215, 1986.

JAGUST, W. J.; FRIEDLAND, R. P.; BUDINGER, T. F. et al. Longitudinal studies of regional cerebral metabolism in Alzheimer's disease. **Neurology.** v. 38, p. 909-912, 1988.

JANETZKY, B.; HAUCK, S.; YODIM, M. B. H. et al. 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.

JENKINS, B. G.; KOROSHETZ, W. J.; BEAL, M. F. et al. Evidence for impairment of energy metabolism *in vivo* in Huntington's disease using localized ¹H NMR spectroscopy. **Neurology.** v. 43, p. 2689-2695, 1993.

JEONG, J. H.; KIM, H. J.; LEE, T. J. et al. Epigallocatechin 3-gallate attenuates neuronal damage induced by 3-hydroxykynurenine. **Toxicology**. v. 195, p. 53-60, 2004.

JOEL, D.; AYALON, L.; TARRASCH, R. et al. Electrolytic lesions of globus pallidus ameliorates the behavioral and neurodegenerative affects of quinolinic acid lesion of striatum. **Brain Res.** v. 78, p. 143-148, 1998.

JONES, D. H.; MATUS, A. I. Isolation of synaptic plasma membrane from brain by combined flotation-sedimentation density gradient centrifugation. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 356, p. 276-287, 1974.

KENNEDY, A. M.; FRACKOWIAK, R. S. J.; NEWMAN, S. K. et al. Deficits in cerebral glucose metabolism demonstrated by position emission tomography in individuals at risk of familial Alzheimer's disease. **Neurosci. Lett.** v. 186, p. 17-20, 1995.

KIM, J. P.; CHOI, D. W. Quinolinate neurotoxicity in cortical cell culture. **Neuroscience**. v. 23, p. 423-432, 1987.

KUHL, D. E.; PHELPS, M. E.; MARKHAM, C. H. et al. Cerebral metabolism and atrophy in Huntington's disease determined by ¹⁸F¹⁸FDG and computed tomographic scan. **Ann. Neurol.** v. 12, p. 425-434, 1982.

KUWERT, T.; LANGE, H. W.; BOECKER, H. et al. Striatal glucose consumption in chorea-free subjects at risk of Huntington's disease. **J. Neurol.** v. 241, p. 31-36, 1993.

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

LAPIN, I. P. Kynurenines and seizures. **Epilepsia.** v. 22, p. 257-265, 1981.

LEE, H. J.; BACH, J. H.; CHAE, H. S. et al. Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase attenuates 3-hydroxykynurenine-induced neuronal cell death. **J. Neurochem.** v. 88, p. 647-656, 2004.

LEES, G. J.; LEHMANN, A.; SANDBERG, M. et al. The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibition, in the rat hippocampus. **Neurosci. Lett.** v. 120, p. 159-162, 1990.

LINGREL, J. B.; KUNTZWEILER, T. Na⁺,K⁺-ATPase. **J. Biochem. Chem.** v. 269, p. 196599-196662, 1994.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v. 193, p. 265-275, 1951.

MACCIONI, R. B.; MUNÓZ, P. J.; BARBEITO, L. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. **Arch. Med. Res.** v. 32, p. 367-381, 2001.

MARKLUND, S. L.; WESTMAN, N. G.; LUNDGREN, E. et al. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. **Cancer Res.** v. 42, p. 1955-1961, 1982.

MARKS, D. B.; MARKS, A. D.; SMITH, C. M. **Basic Medical Biochemistry, A Clinical Approach.** Lippincott Williams & Wilkins, 1996.

MARTILLA, R. J.; ROYTТА, M.; LORENTZ, U. K. et al. Oxygen toxicity protecting enzymes in the human brain. **J. Neural. Tras.** v. 74, p. 87-95, 1988.

MASTROGIACOMO, F.; BERGERON, C.; KISH, S. J. Brain alpha ketoglutarate dehydrogenase complex activity in Alzheimer's disease. **J. Neurochem.** v. 61, p. 2007-2014, 1993.

MAURER, I.; ZIERZ, S.; MÖLLER, H. J. A selective defect of cytochrome *c* oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. **Neurobiol. Aging.** v. 21, p. 455-462, 2000.

MENA, F. V.; BAAB, P. J.; ZIELKE, C. L. et al. *In vivo* glutamine hydrolysis in the formation of extracellular glutamate in the injured rat brain. **J. Neurosci. Res.** v. 60, p. 632-641, 2000.

MILLER, A. L.; KINEY, C. A.; CORDDRY, D. H. et al. Interactions between glucose and ketone body use by developing brain. **Dev. Brain Res.** v. 4, p. 443-450, 1982.

MIZUNO, Y.; SUZUKI, K.; OHTA, S. *Postmortem* changes in mitochondrial respiratory enzymes in brain and a preliminary observation in Parkinson's disease. **J. Neurol. Sci.** v. 96, p. 49-57, 1990.

MIZUNO, Y.; MATUDA, S.; YOSHIRO, H. et al. An immunohistochemical study on α -ketoglutarate dehydrogenase complex in Parkinson's disease. **Ann. Neurol.** v. 35, p. 201-210, 1994.

MUSSO, T.; GUSELLA, G. L.; BROOKS, A. et al. Interleukin-4 inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human monocytes. **Blood.** v. 83, p. 1408-1411, 1994.

NAKAGAMI, Y.; SAITO, H.; KATSUKI, H. 3-Hydroxykynurenine toxicity on the rat striatum *in vivo*. **Jpn. J. Pharmacol.** v. 71, p. 183-186, 1996.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger, Principles of Biochemistry.** 3^a ed. New York: Worth Publishers, 2000.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger, Principles of Biochemistry.** 4^a ed. New York: Worth Publishers, 2004.

OGAWA, T.; MATSON, W. R.; BEAL, M. F. et al. Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease. **Neurology.** v. 42, p. 1702-1706, 1992.

OKUDA, S.; NISHIYAMA, N.; SAITO, H. et al. Hydrogen peroxide-mediated neuronal cell death induced by an endogenous neurotoxin, 3-hydroxykynurenine. **Neurobiology**. v. 93, p. 12553-12558, 1996.

OKUDA, S.; NISHIYAMA, N.; SAITO, H. et al. 3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and regional selectivity. **J. Neurochem**. v. 70, p. 299-307, 1998.

PARKER, W. D.; BOYSON, S. J.; LUDER, A. S. et al. Evidence for a defect in NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) in Huntington's disease. **Neurology**. v. 40, p. 1231-1234, 1990.

PARKER, W. D. Jr.; PARKS J. K.; FILLEY, C. M. et al. Electron transport defects in Alzheimer's disease brain. **Neurology**. v. 44, p. 1090-1096, 1994.

PARKER, W. D. Jr. Sporadic neurologic disease and the electron transport chain: a hypothesis. In: Pascuzzi (Ed.) **Proceedings of the 1989 scientific meeting of the American Society for Neurological Investigation: new developments in neuromuscular disease**. Bloomington: Indiana University Printing Services. v. 1990, p. 59-64, 1989.

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. et al. Quinolinic acid production by macrophages stimulated with IFN- γ , TNF- α and IFN- α . **J. Interferon Cytokine Res.** v. 17, p. 589-595, 1997.

PERKINS, M. N.; STONE, T. W. An ionophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. **Brain Res.** v. 247, p. 184-187, 1982.

PERRY, E. K.; PERRY, R. I. I.; TOMLINSON, B. E. et al. Coenzyme A-acetylating enzymes in Alzheimer's disease: possible cholinergic "compartment" of pyruvate dehydrogenase. **Neurosci. Lett.** v. 18, p. 105-110, 1980.

PETERS, J. C. Tryptophan nutrition and metabolism in man: an overview, in: Schwarcz, R. et al. (Eds.) **Kynurenine and serotonin pathways**. New York: Plenum Press, p. 345-358, 1991.

PRICE, J. M.; BROWN, R. R.; YESS, N. Testing the functional capacity of the tryptophan-niacin pathway in man by analysis of urinary metabolites. **Adv. Metab. Disord.** v. 2, p. 159-225, 1965.

RAPPORT, R. L.; HARRIS, A. B.; FRIEL, P. N. et al. Human epileptic brain Na⁺, K⁺ ATPase activity and phenytoin concentrations. **Arch. Neurol.** v. 32, p. 549-554, 1975.

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

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

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

ROSSEN, R.; KABAT, H.; ANDERSON, J. P. Acute arrest of cerebral circulation in man. **Arch. Neurol. Psychiatr.** v. 50, p. 510-528, 1943.

RUDZITE, V.; JURIKA, E.; JIRGENSONS, J. Changes in membrane fluidity induced by tryptophan and its metabolites. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 467, p. 353-367, 1999.

RUSTIN, P.; CHRETIEN, D.; BOURGERON, T. et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. **Clin. Chim. Acta.** v. 228, p. 5-51, 1994.

SANTAMARIA, A.; GALVAN-ARZATE, S.; LISY, V. et al. Quinolinic acid induces oxidative stress in rat brain synaptosomes. **Neuroreport.** v. 12, p. 871-874, 2001a.

SANTAMARIA, A.; JIMENEZ-CAPDEVILLE, M. E.; CAMACHO, A. et al. *In vivo* hydroxyl formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. **Neuroreport.** v. 12, p. 2693-2696, 2001b.

SCHAPIRA, A. H. V.; COOPER, J. M.; DEXTER, D. et al. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **Lancet.** v. 1, p. 1269, 1989.

SCHAPIRA, A. H. V.; MANN, V. M.; COOPER, J. M. et al. Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. **J. Neurochem.** v. 55, p. 2142-2145, 1990b.

SCHAPIRA, A. H.; COOPER, J. M.; DEXTER, D. et al. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **J. Neurochem.** v. 54, p. 823-827, 1990a.

SCHAPIRA, A. H. Nuclear and mitochondrial genetics in Parkinson's disease. **J. Med. Genet.** v. 32, p. 411-414, 1995.

SCHAPIRA, A. H. Human complex I defects in neurodegenerative diseases. **Biochem. Biophys. Acta.** v. 1364, p. 261-270, 1998.

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.; OKUNO, E., WHITE, R. J. et al. 3-Hydroxyanthranilate oxygenase activity is increased in the brains of Huntington's disease victims. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 85, p. 4079-4081, 1988.

SHEAR, D. A.; DONG, J.; HAIK-OREGUER, K. L. et al. 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.

SILVER, I. A.; DEAS, J.; ERECINSKA, M. Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells. **Neuroscience**. v. 78, p. 589-601, 1997.

SMALL, G. W.; MAZZIOTTA, J. C.; COLLINS, M. T. et al. Apolipoprotein E type 4 allele and cerebral glucose metabolism in relatives at risk for familial Alzheimer's disease. **JAMA** v. 273, p. 942-947, 1995.

SMITH, G. S.; DE LEON, M. J.; KLUGER, A. Topography of cross sectional and longitudinal glucose metabolic deficits in Alzheimer's disease: Pathophysiologic implications. **Arch. Neurol.** v. 49, p. 1142-1150, 1992.

SMITH, D. G.; GUILLEMIN, G. J.; PEMBERTON, L. A. et al. Quinolinic acid is produced by macrophages stimulated by PAF, NEF and TAT. **J. Neurovirol.** v. 7, p. 56-60, 1999.

SPECIALE, C.; WU, H. Q.; CINI, M. et al. (R,S)-3,4-dichlorobenzoylalanine (FCE 28833A) causes a large and persistent increase in brain kynurenic acid levels in rats. **Eur. J. Pharmacol.** v. 315, p. 263-267, 1996.

STONE, T. W.; PERKINS, M. N. Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptor in CNS. **Eur. J. Pharm.** 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. Endogenous neurotoxins from tryptophan. **Toxicon**. v. 39, p. 61-73, 2001.

STOREY, E.; CIPOLLONI, P. B.; FERRANTE, R. J. et al. Movement disorder following excitotoxin lesions in primates. **Neuroreport**. v. 5, p. 1259-1261, 1994.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 481-499, 1996.

STUTCHBURY, G. M.; TRUSTCOTT, R. J. W. The modification of proteins by 3-hydroxykynurenine. **Exp. Eye Res**. v. 57, p. 149-155, 1993.

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

SWERDLOW, R. H.; PARKS, J. K.; MILLER, S. W. et al. Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. **Ann. Neurol**. v. 40, p. 663-671, 1996.

SWERDLOW, R.H.; PARKS, J. K.; CASSARINO, D. S. et al. Cybrids in Alzheimer's disease: a celular model of the disease? **Neurobiology**. v. 49, p. 918-925, 1997.

SWERDLOW, R.H.; PARKS, J. K.; CASSARINO, D. S. et al. Mitochondria in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **Exper. Neurol**. v. 153, p. 135-142, 1998.

TAVARES, R. G.; TASCA, C. I.; SANTOS, C. E. et al. Quinolinic acid inhibits glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain. **Neuroreport**. v. 11, p. 249-253, 2000.

THOMAS, S. R.; MOHR, D.; STOCKER, R. Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase activity in interferon-gamma primed mononuclear phagocytes. **J. Biol. Chem.** v. 269, p. 14457-14464, 1994.

TSAKIRIS, S.; DELICONSTANTINUS, G. Influence of phosphatidylserine on (Na^+, K^+)-stimulated ATPase and acetylcholinesterase activities of dog brain synaptosomal plasma membrane. **Biochem. J.** v. 22, p. 301-307, 1984.

TSAKIRIS, S.; ANGELOGIANNI, P.; SCHULPIS, K. et al. Protective effect of L-cysteine and glutathione on rat brain Na^+, K^+ -ATPase inhibition induced by free radicals. **Z. Naturforsch.** v. 55, p. 271-277, 2000.

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.

VASQUEZ, S.; GARNER, B.; SHEIL, M. M. et al. Characterization of the major autoxidation products of 3-hydroxykynurenine under physiological conditions. **Free Rad. Res.** v. 32, p. 11-23, 2000.

VICARIO, C.; ARIZMENDI, C.; MALLOCH, G. D. A. et al. Lactate utilization by isolated cells from early neonatal rat brain. **J. Neurochem.** v. 57, p. 1700-1707, 1991.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1990.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2000.

WADIA, J. S.; CHALMERS-REDMAN, R. M. E.; JU, W. J. H. et al. Mitochondrial membrane potential and nuclear changes in apoptosis caused by trophic withdrawal: time course and modification by (-) deprenyl. **J. Neurosci.** v. 18, p. 932-947, 1998.

WALLACE, D. C. Mitochondrial diseases in man and mouse. **Science.** v. 283, p. 1482-1487, 1999.

WEISSBACH, H.; KING, W.; SJOERDSMA, A. et al. Formation of indole-3-acetic acid and tryptamine in animals. A method for estimation of indole-3-acetic acid in tissues. **J. Biol. Chem.** v. 234, p. 81-86, 1959.

WHITTAN, R. The dependence of the respiration of brain cortex on active cation transport. **Biochem. J.** v. 82, p. 205-212, 1962.

WIDNER, B.; LEBLHUBER, F.; WALLI, J. et al. Degradation of tryptophan in neurodegenerative disorders. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 467, p. 133-138, 1999.

WIDNER, B.; LEBLHUBER, F.; WALLI, J. et al. Tryptophan degradation and immune activation in Alzheimer's disease. **J. Neural. Trasm.** v. 107, p. 343-353, 2000.

WOLF, H. Studies on tryptophan metabolism in man. **Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.** v. 136, p. 1-186, 1974.

WU, H. Q.; GUIDETTI, P.; GOODMAN, J. H. et al. Kynureninergic manipulations influence excitatory synaptic function and excitotoxic vulnerability in the rat hippocampus *in vivo*. **Neuroscience.** v. 97, p. 243-251, 2000.

WYSE, A. T. S.; BOLOGNESI, G.; BRUSQUE, A. M. Et al. Na⁺,K⁺-ATPase activity in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats subjected to chemically induced phenylketonuria. **Med. Sci. Res.** v.23, p. 261-262, 1995.

WYSE , A. T. S.; BRUSQUE, A. M.; SILVA, C. G. et al. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase from brain cortex by propionic acid. **Neuroreport.** v. 9, p. 17179-1721, 1998.

YOUNG, A. B.; PENNEY, J. B.; STAROSTA-RUBINSTEIN, S. et al. PET scan investigations of Huntington's disease: cerebral metabolic correlates of neurological features and functional decline. **Ann. Neurol.** v. 20, p. 296-303, 1986.