

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

Fernanda Silva Ferreira

**EFEITO NEUROPROTETOR DA COENZIMA Q₁₀ SOBRE A TOXICIDADE DO
ÁCIDO QUINOLÍNICO EM ESTRIADO DE ROEDORES**

Porto Alegre

2022

Fernanda Silva Ferreira

**EFEITO NEUROPROTETOR DA COENZIMA Q₁₀ SOBRE A TOXICIDADE DO
ÁCIDO QUINOLÍNICO EM ESTRIADO DE ROEDORES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Bioquímica.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Angela Terezinha de Souza Wyse

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Ferreira, Fernanda Silva
Efeito neuroprotetor da coenzima Q10 sobre a
toxicidade do ácido quinolínico em estriado de
roedores / Fernanda Silva Ferreira. -- 2022.
112 f.
Orientadora: Angela Wyse.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Coenzima Q10. 2. Ácido quinolínico. 3. Estresse
oxidativo. 4. Neuroinflamação. 5. Comportamento. I.
Wyse, Angela, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

"Life is nothing but an electron looking for a place to rest."

Albert Szent-Györgyi

AGRADECIMENTOS

À UFRGS, por me acolher desde o início da graduação e proporcionar ensino gratuito e de qualidade;

À minha orientadora, Professora Angela, pelo acolhimento no seu grupo, por todo o suporte, pela confiança no meu trabalho, por ser um exemplo de determinação, profissionalismo, dedicação e otimismo. Obrigada também pelo carinho, conselhos e cafezinhos compartilhados;

Ao PPG Bioquímica e seus colaboradores, pela estrutura disponibilizada e pelo auxílio quando necessário;

Às instituições de fomento, CNPq, CAPES e FAPERGS, que permitiram a realização desse trabalho;

À minha família, pelo incentivo, pelo apoio, por acreditar em mim, por entender a ausência muitas vezes necessária. Em especial à minha mãe, Rosângela, meu maior exemplo, meu alicerce, por tanto amor, por confiar tanto em mim e me incentivar tanto;

Aos meus amigos, minha família porto-alegrense, por todo o suporte, pelos momentos de descontração tão necessários, pelo ombro amigo sempre que eu precisei e ajudar em tudo que foi possível;

Ao Guilherme, por todo o carinho, paciência, ajuda e incentivo, perto ou longe.

Aos meus colegas do laboratório 36, em especial os meus companheiros de jornada Tiago, Junior, Josi e Felipe. Muito obrigada pela parceria nos experimentos, nas discussões de trabalhos e principalmente pela amizade, pelo apoio, pelas risadas e pelos happy hour pós-experimentos.

SUMÁRIO

PARTE I	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
LISTA DE FIGURAS	5
1. INTRODUÇÃO	6
1.1 Via das quinureninas	6
1.2 Ácido quinolínico	7
1.3 Ácido quinolínico e doenças do sistema nervoso central	8
1.4 Coenzima Q ₁₀	10
1.5 Estresse oxidativo	12
1.6 Metabolismo energético	14
1.7 Inflamação	16
1.8 Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	18
1.9 Sistema colinérgico	19
1.10 Estriado, memória e motricidade	20
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	21
3. OBJETIVO	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
PARTE II	23
Metodologia e resultados	24
Capítulo 1	26
Capítulo 2	39
PARTE III	69
1. DISCUSSÃO	70
2. CONCLUSÕES	81
3. PERSPECTIVAS	83
4. APOIO FINANCEIRO	84
5. REFERÊNCIAS	85
6. ANEXOS	106
6.1 Carta de aprovação do comitê de ética UFRGS (CEUA/UFRGS)	106

PARTE I

RESUMO

O ácido quinolínico (QUIN), metabólito produzido na degradação do triptofano, é um agonista de receptores NMDA que se encontra em níveis elevados no cérebro em diferentes condições patológicas. O aumento na sua concentração está relacionado a efeitos tóxicos, como por exemplo, na indução da produção de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio, disfunções mitocondriais, ativação de mecanismos inflamatórios e de morte celular. Estudos *in vivo* mostram aumento dos níveis deste metabólito em doenças neurodegenerativas e psiquiátricas. Sendo assim, faz-se necessário investigar estratégias de neuroproteção capazes de neutralizar os efeitos deletérios de QUIN no cérebro. A Coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀) é uma pró-vitamina lipossolúvel, presente majoritariamente na membrana interna mitocondrial que possui importante ação antioxidante e anti-inflamatória. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o possível efeito neuroprotetor da CoQ₁₀ frente à toxicidade causada pelo QUIN em estriado de roedores, utilizando protocolos experimentais de estudos *ex vivo* e *in vivo*. Foram analisados parâmetros comportamentais, bioquímicos (equilíbrio redox, metabolismo energético, atividade enzimática e marcadores inflamatórios) e morfológicos em estriado de ratos Wistar jovens. A parte I do presente trabalho foi realizada *ex vivo*. Fatias estriatais de ratos Wistar machos com 30 dias de idade foram pré-incubadas com CoQ₁₀ em quatro concentrações distintas (25, 50, 75 e 100 µM) e posteriormente foram expostas ao QUIN (100 µM). A concentração de 100 µM de CoQ₁₀ foi capaz de prevenir o aumento na oxidação de H₂DCF, de níveis de nitritos e da atividade de acetilcolinesterase causados por QUIN, sendo a concentração selecionada para a continuação do trabalho. QUIN provocou um aumento na razão das enzimas SOD/CAT e nos níveis de TBARS e diminuição na atividade da enzima GPx, no conteúdo de glutatona e de sulfidrilas. QUIN reduziu a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase, dos complexos mitocondriais I, II e IV, os níveis de ATP intracelular e alterou o imunoc conteúdo da proteína Erk-1. A pré-incubação com CoQ₁₀ foi capaz de prevenir parcialmente alterações na razão SOD/CAT, no conteúdo de glutatona e nos níveis de ATP, bem como preveniu totalmente o aumento na atividade da GPx, nos níveis de TBARS e a redução da atividade dos complexos I, II e IV. A parte II utilizou metodologia *in vivo*. Ratos Wistar machos de 21 dias de idade receberam um pré-tratamento com CoQ₁₀ 10mg/kg/dia por 10 dias. Ao trigésimo dia, foi realizada uma injeção intraestriatal de QUIN 150 nM. Após 60 minutos e/ou após as avaliações comportamentais, os animais foram eutanasiados para as avaliações morfológicas e bioquímicas. Os resultados mostraram que o QUIN alterou os parâmetros comportamentais avaliados através dos testes de campo aberto, reconhecimento de objetos e *pole test*. O QUIN também causou alterações na expressão gênica, aumentando os marcadores inflamatórios TNF-α, IL-1β, IL-6 e MCP-1 e diminuindo as enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx. A administração de QUIN também diminuiu o imunoc conteúdo de Nrf2 e p-Nf-κB. O pré-tratamento com CoQ₁₀ preveniu as alterações em todos os parâmetros comportamentais avaliados. Este composto também preveniu totalmente o aumento na expressão de IL-1β e parcialmente o aumento de IL-6. A redução na expressão de SOD, GPx e no imunoc conteúdo de Nrf2 também foi prevenido totalmente, enquanto a alteração no imunoc conteúdo de p-Nf-κB apresentou prevenção parcial. A associação de QUIN e CoQ₁₀ causou o aumento na expressão de TNF-α, MCP-1 e IL-10. Quanto às análises morfológicas, o conteúdo de neurônios e astrócitos não foram alterados pelo QUIN e/ou CoQ₁₀. Os resultados do presente trabalho mostram o potencial protetor da CoQ₁₀ frente à danos cerebrais quimicamente induzidos por QUIN. A suplementação com CoQ₁₀ se apresenta como uma alternativa terapêutica interessante para a prevenção de doenças neurodegenerativas, porém mais estudos são necessários para elucidar seus mecanismos de ação.

Palavras-chave: Coenzima Q₁₀, ácido quinolínico, neuroinflamação, estresse oxidativo, comportamento, metabolismo energético

ABSTRACT

Quinolinic acid (QUIN), a metabolite produced in the degradation of tryptophan, is an agonist of NMDA receptors found at high levels in the brain in different pathological conditions. The increase in its concentration is related to toxic effects, such as inducing the production of reactive oxygen/nitrogen species, mitochondrial dysfunction, activation of inflammatory mechanisms, and cell death. *In vivo* studies show increased levels of this metabolite in neurodegenerative and psychiatric diseases. Therefore, it is necessary to investigate neuroprotection strategies capable of neutralizing the deleterious effects of QUIN in the brain. Coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) is a fat-soluble provitamin, present mainly in the inner mitochondrial membrane, which has an important antioxidant and anti-inflammatory action. This work aimed to evaluate the possible neuroprotective effect of CoQ₁₀ against the toxicity caused by QUIN in the striatum of rodents, using experimental protocols of *ex vivo* and *in vivo* studies. Behavioral, biochemical (redox balance, energy metabolism, enzymatic activity, and inflammatory markers) and morphological parameters were analyzed in the striatum of young Wistar rats. Part I of the present work was performed *ex vivo*. Striatal slices from thirty-day-old male Wistar rats were pre-incubated with CoQ₁₀ at four different concentrations (25, 50, 75, and 100 μM) and subsequently exposed to QUIN (100 μM). The concentration of 100 μM of CoQ₁₀ was able to prevent the increase in H₂DCF oxidation, nitrite levels, and acetylcholinesterase activity caused by QUIN, being the concentration selected for the continuation of the work. QUIN caused an increase in SOD/CAT enzyme ratio and TBARS levels and a decrease in GPx enzyme activity, glutathione content, and sulfhydryl content. QUIN reduced the activity of the enzyme Na⁺,K⁺-ATPase, mitochondrial complexes I, II, and IV, the levels of intracellular ATP, and altered the immunocontent of the Erk-1 protein. . Pre-incubation with CoQ₁₀ was able to partially prevent changes in SOD/CAT ratio, glutathione content, and ATP levels, as well as prevent the increase in GPx activity, TBARS levels, and the reduction of complex activity. I, II, and IV. Part II used *in vivo* methodology. Twenty-one-day-old male Wistar rats received pretreatment with CoQ₁₀ 10mg/kg/day for 10 days. On the thirtieth day, intrastriatal injection of QUIN 150 nM was performed. After 60 minutes or after the behavioral evaluations, the animals were euthanized for morphological and biochemical evaluations. The results showed that the QUIN altered the behavioral parameters evaluated through the open field, object recognition, and vertical pole tests. QUIN also caused alterations in gene expression, increasing the inflammatory markers TNF-α, IL-1β, IL-6, and MCP-1 and decreasing the antioxidant enzymes CAT, SOD, and GPx. QUIN administration also decreased the immunocontent of Nrf2 and p-Nf-κB. Pretreatment with CoQ₁₀ prevented changes in all behavioral parameters evaluated. This compound also totally prevented the increase in IL-1β expression and partially the increase in IL-6. The reduction in the expression of SOD, GPx, and the Nrf2 immunocontent was also totally prevented, while the alteration in the immunocontent of p-Nf-κB showed partial prevention. The association of QUIN and CoQ₁₀ caused an increase in the expression of TNF-α, MCP-1, and IL-10. Regarding to morphological analyses, the content of neurons and astrocytes were not altered by QUIN and/or CoQ₁₀. The results of the present work show the protective potential of CoQ₁₀ against chemically induced brain damage by QUIN. CoQ₁₀ supplementation may be an interesting therapeutic alternative for the prevention of the neurodegenerative diseases, but more studies are needed to elucidate its mechanisms of action.

Keywords: coenzyme Q₁₀, quinolinic acid, neuroinflammation, oxidative stress, behavior, energetic metabolism

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE	acetilcolinesterase
ARE	elemento da resposta antioxidante
ATP	adenosina trifosfato
CAT	catalase
CoQ ₁₀	Coenzima Q ₁₀
CTE	cadeia transportadora de elétrons
DA	Doença de Alzheimer
DH	Doença de Huntington
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
GPx	glutathionaperoxidase
IDO	indoleamina-2,3-dioxigenase
KAT	quinureninas aminotransferases
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated Protein 1</i>
KMO	quinurenina 3-monooxigenase
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo
Nf-κB	fator nuclear <i>kappa</i> B
NMDA	N-metil-D-aspartato
Nrf2	<i>factor erythroid 2-related factor 2</i>
QFRT	quinolinato fosforibosiltransferase
QUIN	ácido quinolínico
SDH	succinato desidrogenase
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
TBARS	espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TDO	triptofano-2,3-dioxigenase
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
TRP	triptofano

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via das quinureninas.....	7
Figura 2. Diferentes estados redox da Coenzima Q ₁₀	10

1. INTRODUÇÃO

1.1 VIA DAS QUINURENINAS

O triptofano (Trp) é um aminoácido essencial com importantes funções fisiológicas, como participação na síntese proteica e agindo como precursor de neurotransmissores. Sua degradação no cérebro pode acontecer de duas formas: via metoxi-indol ou via das quinureninas. A via do metoxi-indol é responsável pela degradação de cerca de 1-5% do Trp e leva a produção de serotonina, e na glândula pineal, de melatonina. Já a via das quinureninas é responsável pela formação do cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) e realiza catabolismo de cerca de 95-99% do Trp disponível (JEON; KIM, 2017; MOR et al., 2021; STONE, 1993).

A via das quinureninas (Figura 1) é a principal rota de metabolização do Trp, ocorrendo principalmente no fígado. A ativação extra-hepática dessa via acontece principalmente em situações de ativação da resposta imune, e por não possuir todas as enzimas da via, resulta na produção de intermediários específicos em cada tecido (BADAWY, 2017). O catabolismo do Trp leva à formação de quinurenina pela ação da enzima triptofano-2,3-dioxigenase (TDO) no fígado ou pela indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) no cérebro (LUGO-HUITRÓN et al., 2013; MOR et al., 2021). A quinurenina pode ser catabolizada por duas vias, levando à produção de ácido quinurênico pelas quinureninasaminotransferases (KATs) ou à formação de NAD⁺, pela quinurenina 3-monooxigenase (KMO). No cérebro, essas reações ocorrem majoritariamente nos astrócitos e na microglia (JEON; KIM, 2017). Em condições de equilíbrio, a via das quinureninas produz concentrações baixas de seus metabólitos intermediários e as quantidades necessárias de NAD⁺ para ações fisiológicas. Porém, em situações patológicas, há um aumento na ativação desta rota e conseqüentemente a saturação da enzima quinolinato fosforibosiltransferase

(QFRT), responsável pela conversão de ácido quinolínico (QUIN) a NAD^+ , o que leva ao aumento nas concentrações deste metabólito no sistema nervoso central (SNC) (JACOBS et al., 2017; MOR et al., 2021).

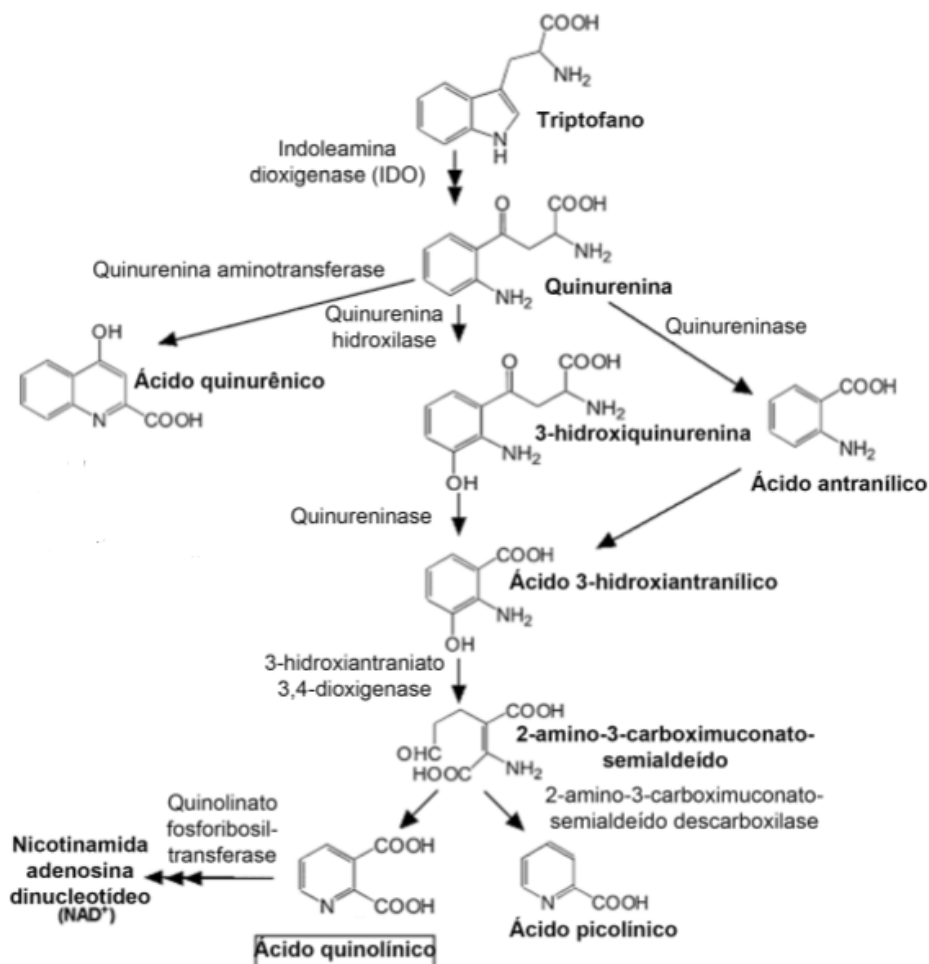


Figura 1: via das quinureninas (adaptado de Guillemín *et al*, 2012)

1.2 ÁCIDO QUINOLÍNICO

O ácido quinolínico (QUIN) é um importante metabólito gerado na via das quinureninas que age como agonista seletivo de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), sendo produzido pelas células da microglia e por macrófagos ativados. Fisiologicamente, este composto está presente em baixas concentrações no sistema nervoso central (SNC), em concentrações abaixo de 100 nM (CIAPAŁA; MIKA;

ROJEWSKA, 2021). Porém em situações patológicas, devido à saturação da enzima QFRT, há um aumento considerável da sua concentração no SNC, o que pode acarretar danos aos tecidos (SCHWARCZ; STONE, 2017; STONE, 1993).

Os efeitos neurotóxicos de QUIN no SNC são diversos, sendo que a produção de espécies reativas, a alteração da função mitocondrial e a ativação de processos inflamatórios são considerados importantes mecanismos de ação desse metabólito (KOTLAR et al., 2019; LUGO-HUITRÓN et al., 2013; MOR et al., 2021). A ativação de receptores NMDA por QUIN causa excitotoxicidade e aumento do influxo de Ca^{2+} , levando a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ERO/ERN, respectivamente), disfunção mitocondrial, diminuição dos níveis de adenosina trifosfato (ATP), ativação de vias de morte celular, entre outros (CRUZ; CARRILLO-MORA; SANTAMARÍA, 2013; HOSOI et al., 2021; HUANG et al., 2022; JEON; KIM, 2017).

Os efeitos neurotóxicos de QUIN também podem acontecer por mecanismos independentes da ativação dos receptores NMDA. Estudos demonstram que pode haver a formação de complexos QUIN com Ferro (KUBICOVA; HADACEK; CHOBOT, 2013; MOR et al., 2021), causando um aumento na produção de ERO. A produção de ERO/ERN é bastante prejudicial ao SNC, pois o sistema antioxidante do cérebro é limitado, podendo resultar em danos a proteínas, DNA e peroxidação lipídica (FERREIRA et al., 2018; SAS; SZABÓ; VÉCSEI, 2018; TAVARES et al., 2008).

1.3 ÁCIDO QUINOLÍNICO E DOENÇAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Devido aos seus efeitos tóxicos, o aumento nas concentrações de QUIN no SNC está diretamente relacionado ao desenvolvimento e progressão de diversas

doenças. Na doença de Alzheimer, observa-se uma ativação da via das quinureninas e um aumento na produção de QUIN no hipocampo e no neocórtex (GULAJ et al., 2010), o que está relacionado com a manutenção do estado neuroinflamatório, inibição da captação de glutamato pelos astrócitos, hiperfosforilação da proteína Tau, maior formação de agregados de peptídeos amiloides A β 1-42 e manifestação mais intensa de demência nos pacientes (GUILLEMIN et al., 2003; LIANG et al., 2022; WU et al., 2013). Em condições psiquiátricas, como por exemplo, depressão associada à tentativa de suicídio os níveis de QUIN também encontram-se aumentados no plasma, com ativação de receptores glutamatérgicos e manutenção do estado inflamatório no cérebro (ERHARDT et al., 2013; GUILLEMIN; KERR; BREW, 2005). Pacientes com a doença de Parkinson apresentam níveis altos de QUIN na região nigroestriatal (VENKATESAN et al., 2020).

No cérebro de pacientes com Doença de Huntington (DH) os níveis de QUIN também aumentam no estriado e no córtex cerebral, regiões mais afetadas pela doença (GUIDETTI et al., 2004; PIRES et al., 2022). Observa-se degeneração dos neurônios dopaminérgicos e GABAérgicos, resultando em sintomas clássicos da doença, como a coreia e a bradicinesia (WIPRICH; BONAN, 2021). As mudanças observadas nos neurotransmissores estão relacionadas a importantes alterações bioquímicas, como diminuição da atividade mitocondrial, e alterações no estado pró-inflamatório. Diversos estudos pré-clínicos demonstram que a administração intracerebral de QUIN mimetiza os sintomas e danos neuronais observados na DH, demonstrando sua relação direta com a patologia e que este composto pode ser utilizado como modelo químico para estudos (ANTUNES WILHELM et al., 2013a; COLLE et al., 2012; JAMWAL et al., 2017; PIEROZAN et al., 2014).

1.4 COENZIMA Q₁₀

A Coenzima Q₁₀ (2,3-dimetoxi-5-metil-6-decaprenil-1,4-benzoquinona- CoQ₁₀) é um composto lipossolúvel derivado das benzoquinonas, com estrutura semelhante a vitamina K que pode ser sintetizado endogenamente, a partir de acetil-CoA pela via do mevalonato, ou obtida através da dieta - carne vermelha, aves e peixes são fontes ricas neste composto. Ela está presente em todas as células do corpo humano, sendo as maiores concentrações encontradas no cérebro, coração, fígado e músculo esquelético (SPINDLER; FLINT BEAL; HENCHCLIFFE, 2009). Localiza-se majoritariamente na membrana interna mitocondrial, onde participa da transferência de elétrons dos complexos I e II e age como coenzima do complexo III na cadeia respiratória (BHARDWAJ; KUMAR, 2016). Também pode ser encontrada na membrana de organelas celulares como retículo endoplasmático, peroxissomos, lisossomos e vesículas (KUMAR et al., 2009).

Quanto a sua estrutura química, a CoQ₁₀ pertence a uma série de compostos que compartilham na sua estrutura um anel benzoquinona porém apresentam diferentes comprimentos da cadeia poliisoprenóide - o tamanho da cadeia varia entre as espécies, e nos seres humanos, por apresentar 10 subunidades em sua cadeia recebeu a nomenclatura Q₁₀ (CRANE; SUN; SUN, 1993; ZHU et al., 2016).

A CoQ₁₀ pode estar presente nos tecidos em três formas, a oxidada (ubiquinona), a parcialmente reduzida (ubisemiquinona) e a completamente reduzida (ubiquinol) (Figura 2) (AASETH; ALEXANDER; ALEHAGEN, 2021). Na forma de ubiquinol, apresenta ação antioxidante impedindo peroxidação na membrana mitocondrial e é responsável pela ativação de proteínas desacopladoras mitocondriais (UCPs) (SPINDLER; FLINT BEAL; HENCHCLIFFE, 2009). Além de seus efeitos mitocondriais, exerce ação antioxidante, protegendo da peroxidação

lipídica da membrana plasmática, inibindo a ação de radicais livres por sua atividade *per se* e pela regeneração de outros importantes antioxidantes celulares, com o α -tocoferol e o ácido ascórbico (EL-AAL; EL-FATTAH; EL-ABHAR, 2017). Seus efeitos anti-inflamatórios também são descritos na literatura, agindo pela inibição de mediadores pró-inflamatórios como fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucinas (IL-1 β e IL-6), (CORNELIUS et al., 2017; GHASEMLOO et al., 2021a; SHARMA; EL REFAEY; EBADI, 2006; SPINDLER; FLINT BEAL; HENCHCLIFFE, 2009). Apresenta efeitos benéficos na modulação da transcrição gênica e na prevenção da ativação de cascatas de sinalização de apoptose (CORNELIUS et al., 2017; SHARMA; EL REFAEY; EBADI, 2006; SPINDLER; FLINT BEAL; HENCHCLIFFE, 2009).

Recentemente, estudos *in vivo* e *in vitro* evidenciam a capacidade neuroprotetora da CoQ₁₀ em modelos de isquemia cerebral e das Doenças de Parkinson e Alzheimer (DUMONT et al., 2011; EL-AAL; EL-FATTAH; EL-ABHAR, 2017; HARGREAVES; HEATON; MANTLE, 2020; RAUCHOVÁ, 2021). Além disso, a sua suplementação tem sido utilizada em pacientes como estratégia de tratamento em doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, bem como em pacientes com miopatias decorrentes do uso de estatinas (MARCHEGGIANI et al., 2021; MOLLAZADEH et al., 2021; SHARIFI et al., 2015; ZHU et al., 2016).

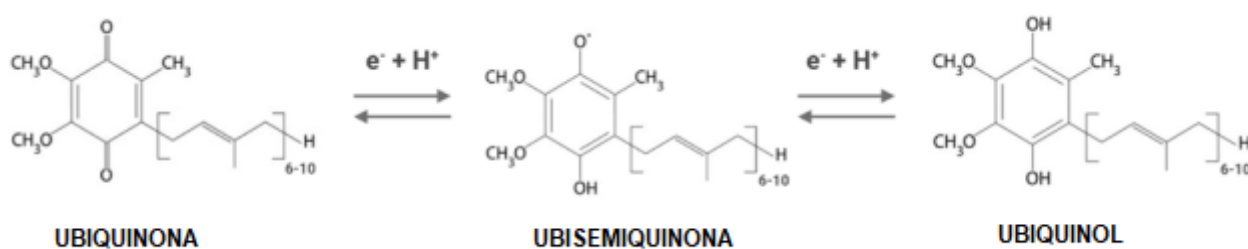


Figura 2: Diferentes estados redox da Coenzima Q₁₀(adaptado de *Pallotti, 2022*)

1.5 ESTRESSE OXIDATIVO

As espécies reativas são moléculas instáveis, capazes de modificar outros compostos com os quais interagem em meio celular. Essas espécies podem ser radiculares ou não. Radicais livres são caracterizados pela presença de um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo, tornando-os moléculas reativas. A produção de radicais livres acontece majoritariamente na membrana mitocondrial interna de maneira fisiológica. Sua produção em proporções adequadas tem funções fisiológicas importantes, como a geração de ATP, a ativação de genes, a contribuição com a transferência de elétrons em reações bioquímicas e a participação de mecanismos de defesa em processos infecciosos (DI MEO; VENDITTI, 2020; HALLIWELL, 1994; HEMAGIRRI; SASIDHARAN, 2022).

Em condições fisiológicas, as espécies reativas são mantidas em equilíbrio pela ação do sistema de defesa antioxidante do organismo. Esse sistema é capaz de inibir ou reduzir possíveis danos causados pela ação deletéria das espécies reativas, sendo composto por defesas enzimáticas e não enzimáticas. O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx) (DI MEO; VENDITTI, 2020; HALLIWELL, 2011). A SOD é a enzima responsável por catalisar a reação de dismutação do $O_2^{\cdot-}$, formando H_2O_2 e O_2 . O H_2O_2 resultante é removido pela ação das enzimas CAT e GPx. A CAT é encontrada principalmente nos peroxissomos dos tecidos enquanto a GPx localiza-se nas membranas celulares (HALLIWELL, 2011; HEMAGIRRI; SASIDHARAN, 2022; RAHAL et al., 2014). O sistema de defesa não enzimático, por sua vez, é composto por glutathione, ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), flavonóides, CoQ₁₀ entre outros (POPRAC et al., 2017; RAHAL et al., 2014).

Existem fatores de transcrição diretamente envolvidos com a regulação do equilíbrio redox. Dentre eles, um dos principais é o Nrf2 (do inglês *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) (BELLEZZA et al., 2018; NITURE; KHATRI; JAISWAL, 2014). Sua ativação induz a expressão de genes de codificam proteínas e enzimas antioxidantes, desempenhando um papel fundamental na proteção e sobrevivência celular. Dentre os seus genes alvo, podem ser citados: heme oxigenase1 (HO-1), SOD, CAT, GPx, glutathiona redutase (GR), NADPH quinona oxidoreductase 1 (NQO1) (NITURE; KHATRI; JAISWAL, 2014). Em condições fisiológicas o Nrf2 encontra-se no citosol, ancorado em proteínas Keap1 (do inglês *Kelch-like ECH-associated Protein 1*). Na presença de estímulos patológicos, resíduos de cisteína das proteínas Keap1 são oxidados, resultando em alteração em sua conformação e consequente liberação do Nrf2. Este se transloca para o núcleo celular e se liga ao elemento da resposta antioxidante (ARE), na região promotora dos genes alvos, iniciando o processo de transcrição (BAIRD; YAMAMOTO, 2020).

Além de sua importância como mediador da resposta antioxidante, o Nrf2 também é responsável pela modulação de diversos genes que são fundamentais em outros processos celulares, incluindo a resposta inflamatória, regulação metabólica, proliferação celular e função mitocondrial (HOLMSTRÖM; KOSTOV; DINKOVA-KOSTOVA, 2017; SAHA et al., 2020).

O estresse oxidativo é definido por um desequilíbrio na produção e detoxificação de espécies reativas, sendo considerado um dos principais causadores de danos celulares. O cérebro é particularmente suscetível a danos oxidativos, devido ao alto consumo de oxigênio, a baixa concentração de defesas antioxidantes e a presença de lipídios de membrana. Elevadas concentrações de espécies reativas causam danos às biomoléculas, como proteínas, lipídios e DNA, podendo

levar a perda de função celular e estão diretamente relacionadas às alterações encontradas em doenças neurodegenerativas (HALLIWELL, 2006; RAHAL et al., 2014; SINGH et al., 2019).

Um dos principais mecanismos relacionados aos danos gerados pelo QUIN é o estresse oxidativo. O aumento da sua concentração causa aumento nas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e diminuição da atividade de enzimas antioxidantes e dos níveis de glutatona (CRUZ; CARRILLO-MORA; SANTAMARÍA, 2013; FERREIRA et al., 2018, 2020; MOR et al., 2021), além de alterar a expressão de Nrf2 (COLÍN-GONZÁLEZ et al., 2014; FERREIRA et al., 2018), o que pode influenciar na expressão de defesas antioxidantes e outros mecanismos de defesa celular.

1.6 METABOLISMO ENERGÉTICO

Devido à sua intensa atividade e baixa concentração de reserva energética, o cérebro necessita de aporte energético contínuo. Este se dá através da glicólise, do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa, que em sequência produzem a energia utilizada para manutenção das atividades cerebrais (HUSSAIN BHAT et al., 2015; SOUSA; D'IMPRIMA; VONCK, 2018).

A mitocôndria é uma organela com papel fundamental na manutenção do funcionamento celular. Sua principal função é a produção de ATP, essencial não só para o cérebro, mas para todas as atividades celulares. Redução nos níveis de ATP pode resultar em desequilíbrio na homeostase dos tecidos, causando danos oxidativos, excitotóxicos e levando ao início de processos apoptóticos. Além disso, a mitocôndria está envolvida com a sinalização intracelular, metabolismo de

aminoácidos, entre outros (SOUSA; D'IMPRIMA; VONCK, 2018; SUN; YOULE; FINKEL, 2016).

A produção de ATP acontece na membrana mitocondrial interna através da cadeia transportadora de elétrons (CTE), composta por quatro complexos enzimáticos e dois transportadores móveis de elétrons. Os elétrons provenientes do NADH são entregues ao complexo I (NADH desidrogenase), sendo transferidos para a ubiquinona, resultando na formação de ubiquinol. O complexo II (succinato:ubiquinona oxidoredutase) é formado pela enzima succinato desidrogenase (SDH) e mais três subunidades. Neste complexo, há a redução da ubiquinona a ubiquinol com elétrons provenientes do FADH_2 . É importante ressaltar a atividade essencial exercida pela CoQ_{10} nesta etapa do processo. O complexo III (ubiquinona-citocromo c oxirredutase) transfere os elétrons do ubiquinol para o citocromo c, e o complexo IV (citocromo c oxidase), realiza a transferência dos elétrons do citocromo c para o O_2 , reduzindo-o a H_2O . Através deste fluxo de elétrons acontece o bombeamento de prótons realizado pelos complexos I, III e IV da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. Com isso, há a formação de um gradiente eletroquímico utilizado como força próton-motriz pelo complexo V (ATP sintase) para a síntese de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (P_i) (MAZAT; DEVIN; RANSAC, 2020).

Alterações no funcionamento normal da CTE, comprometimento da função e a perda da integridade mitocondrial estão relacionados a doenças neurodegenerativas, câncer, diabetes, obesidade e envelhecimento (SUN; YOULE; FINKEL, 2016; WILKINS; MORRIS, 2017). As disfunções mitocondriais contribuem diretamente nas etapas iniciais da neurodegeneração, causando acúmulo de proteínas anômalas nos tecidos, gerando excesso de ROS e diminuindo a

concentração de ATP disponível (MONZIO COMPAGNONI et al., 2020). A toxicidade causada por QUIN exerce efeitos sobre o metabolismo energético celular, produzindo disfunção mitocondrial progressiva e levando a alteração da atividade dos complexos II, II-III e IV da cadeia respiratória, inibição das enzimas PEP carboxiquinase, piruvato quinase, e diminuição dos níveis de ATP em cérebro de ratos (FERREIRA et al., 2018; LUGO-HUITRÓN et al., 2013; SAS; SZABÓ; VÉCSEI, 2018)

1.7 INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma resposta do organismo a estímulos nocivos ou agentes infecciosos. Este processo inicialmente envolve a ativação celular, com liberação de mediadores inflamatórios e recrutamento de defesas a partir da circulação (COLTON, 2009; ZHANG, 2008). Apesar de suas características protetoras e sua função de recuperação celular, podem acontecer alterações nesses processos tornando a inflamação grave e crônica. A continuidade do processo inflamatório pode causar lesões teciduais e morte celular, o que é reportado em doenças neurodegenerativas e psiquiátricas (MAES et al., 2009; MEYER et al., 2018).

A inflamação associada ao SNC é denominada neuroinflamação, sendo caracterizada pela ativação de células da glia (XANTHOS; SANDKÜHLER, 2014). O SNC é tipicamente um local imunologicamente privilegiado, uma vez que as células imunes periféricas são geralmente bloqueadas pela barreira cérebro-sangue (DAS SARMA, 2014). No entanto, a ativação microglial e astrocitária promove a liberação de uma série de fatores que modulam mediadores pró e anti-inflamatórios (citocinas, quimiocinas, óxido nítrico e ERO) que, por sua vez, regulam positivamente moléculas de adesão, aumentando a permeabilidade da barreira cérebro-sangue,

facilitando a invasão de células imunes periféricas e induzindo a liberação de moléculas potencialmente tóxicas, podendo comprometer células cerebrais (LUCAS; ROTHWELL; GIBSON, 2006).

O fator de transcrição Nf- κ B (*nuclear factor kappa B*) é essencial na regulação de vários processos biológicos, incluindo o desenvolvimento do sistema imunológico, inflamação e respostas imunes inatas e adaptativas. Em condições não patológicas sua ativação está relacionada a plasticidade, desenvolvimento neural e atividade sináptica. Se localiza no citoplasma celular, ligado à proteína inibitória I κ B, formando um complexo inativo. Ao receber um estímulo, o I κ B é fosforilado e degradado, liberando o Nf- κ B e permitindo sua translocação para o núcleo da célula, onde ativa a expressão de genes específicos. Em situações inflamatórias, é um importante regulador da expressão gênica pró-inflamatória, mediando a síntese de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, entre outras (MULERO; HUXFORD; GHOSH, 2019; SUN, 2017).

As citocinas são proteínas secretadas frente a um estímulo e agem na fase inicial e crônica da resposta inflamatória, sendo responsáveis por mobilizar e recrutar as células de defesa. Na periferia, estes mediadores são produzidos por monócitos, macrófagos, linfócitos, entre outros, e no SNC são produzidos pelas células da glia. As citocinas podem apresentar perfil pró ou anti-inflamatório e estão envolvidas na regulação direta das reações inflamatórias (MUKAI et al., 2018; ZHANG; AN, 2007).

TNF- α , IL-1 β e IL-6 são exemplos de citocinas pró-inflamatórias, sendo liberadas frente a um estímulo inflamatório e regulando de forma positiva a manutenção da inflamação. O TNF- α também tem a função de ativador do sistema imunológico, recrutando células em repouso, além de ativar fatores de transcrição como o Nf- κ B. As citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, são moléculas que

inibem a resposta das citocinas pró-inflamatórias, regulando a resposta imune (MEHTA; GRACIAS; CROFT, 2018; VARFOLOMEEV; VUCIC, 2018; ZHANG; AN, 2007).

As quimiocinas, como a MCP-1, são um grupo de pequenas citocinas envolvidas no processo de quimiotaxia, sendo responsáveis pela seleção, ativação e migração de células de defesa (MUKAI et al., 2018; SINGH; ANSHITA; RAVICHANDIRAN, 2021).

Em concentrações elevadas, QUIN leva a ativação da microglia, induzindo a expressão e liberação de citocinas pró-inflamatória, potencializando a resposta inflamatória, o que pode comprometer a viabilidade celular (BRAIDY; GRANT, 2017; FERREIRA et al., 2020).

1.8 Na⁺,K⁺-ATPase

A Na⁺,K⁺-ATPase é uma proteína integral de membrana responsável por uma série de funções na células, como transporte de moléculas, regulação do volume celular, como a manutenção do potencial de membrana, excitabilidade neuronal, entre outras. Sua atividade é dependente da energia gerada pela hidrólise do ATP, para transportar simultaneamente 3 íons Na⁺ para o compartimento extracelular e 2 íons K⁺ para o meio intracelular, gerando um gradiente eletroquímico (KAPLAN, 2002; OGAWA et al., 2009; SHRIVASTAVA; TRILLER; MELKI, 2020; WAUGH, 2019).

Estruturalmente, a Na⁺,K⁺-ATPase apresenta duas subunidades α , duas subunidades β e uma subunidade γ . A subunidade α é responsável pela atividade catalítica da enzima e contém os sítios de ligação para os íons Na⁺ e K⁺, ATP e também para a ouabaína (inibidor específico da enzima). Já a subunidade β é uma

proteína de adesão celular responsável por direcionar a subunidade α para a membrana plasmática. A subunidade γ é responsável pela modulação da atividade da enzima. A inibição da atividade desta enzima tem sido relacionada a diversas patologias do SNC, como doenças neurodegenerativas e depressão (APERIA, 2007; GOLDSTEIN et al., 2006; KINOSHITA et al., 2022).

Estudos anteriores em modelos *in vivo* e *ex vivo* demonstraram que QUIN causa alterações na atividade da Na^+, K^+ -ATPase (FERREIRA et al., 2018, 2020).

1.9 SISTEMA COLINÉRGICO

O sistema colinérgico é responsável por várias funções importantes do SNC, como transmissão nervosa, aprendizado, memória e contração muscular (DJEMIL; SAMES; PAK, 2022; PERRY et al., 1999; SARTER; BRUNO, 1997; SCHERER et al., 2014). A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) e tem sido considerada uma reguladora de processos inflamatórios (HAN; LI; HAO, 2017; PAVLOV; TRACEY, 2005; ROSAS-BALLINA; TRACEY, 2009; SCHERER et al., 2014; WANG et al., 2003). A via antiinflamatória colinérgica sugere que a ACh, através da estimulação do nervo vago, é capaz de transmitir sinais neurais para inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (ALEN, 2022; PAVLOV et al., 2009). Alterações nos níveis de ACh e de AChE têm sido relacionadas a vários distúrbios cerebrais, como Alzheimer, Parkinson e Huntington (ALBIN et al., 2022; RAMOS-MARTÍNEZ et al., 2021; ZONG et al., 2022). Compostos tóxicos como o QUIN agem de forma importante no sistema colinérgico, alterando a atividade da AChE e conseqüentemente os níveis de ACh no SNC (FERREIRA et al., 2020; FOUCAULT-FRUCHARD et al., 2018; FUJIGAKI; YAMAMOTO; SAITO, 2017).

1.10 ESTRIADO, MEMÓRIA E MOTRICIDADE

O corpo estriado é uma estrutura dos núcleos da base essencial na modulação dos movimentos voluntários fixos executados pelo corpo, realizando transmissão de impulsos nervosos, planejando e ajustando as ações. Além disso, está envolvido na modulação de mecanismos de memória de trabalho, de movimentos oculares e em mecanismos de recompensa/motivação (YANAGISAWA, 2018).

Por seu papel essencial na dinâmica do SNC e suas conexões diretas com o córtex cerebral e o tálamo, alterações na fisiologia estriatal estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento e manutenção de diversas patologias, como as doenças neurodegenerativas. Estudos já demonstraram os danos estriatais relacionados às doenças de Parkinson e Huntington, resultando em sintomas motores como bradicinesia e coreia, além da relação com o déficit cognitivo (PÉREZ-DE LA CRUZ et al., 2009; VENKATESAN et al., 2020).

O uso de tarefas comportamentais específicas permite elucidar as alterações causadas por substâncias tóxicas, como QUIN, nas estruturas cerebrais e avaliar possíveis mecanismos relacionados.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Visto que o aumento nos níveis de QUIN está relacionado a diversas desordens do SNC e que este metabólito age de maneira tóxica no SNC por diversos mecanismos de ação ainda não totalmente conhecidos, faz-se necessário continuar avaliando seus efeitos, bem como investigar possíveis estratégias de proteção capazes de neutralizar os efeitos neurotóxicos deste metabólito. Nossa hipótese é de que o pré-tratamento com CoQ₁₀ exerce efeitos protetores frente aos danos causados por QUIN.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral da tese foi avaliar o possível efeito neuroprotetor da Coenzima Q₁₀ sobre alterações comportamentais, morfológicas e bioquímicas (oxidativas, energéticas e inflamatórias) causadas pelo ácido quinolínico no estriado de ratos Wistar machos jovens, utilizando metodologias *ex vivo* e *in vivo*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

CAPÍTULO I. *Ex vivo*

Avaliação dos efeitos neuroprotetores da CoQ₁₀ frente ao insulto causado por QUIN em fatias estriatais de ratos Wistar jovens.

- a. Avaliação de diferentes doses de CoQ₁₀, através da realização de uma curva de dose-resposta, analisando os seguintes parâmetros: oxidação de H₂DCF, níveis de nitritos, atividade da AChE;
- b. Avaliação de viabilidade celular, através de ensaio colorimétrico (MTT);

- c. Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo: atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx); conteúdo de sulfidrilas, níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), dano ao DNA e conteúdo de glutathione (GSH);
- d. Avaliação de parâmetros de metabolismo energético: atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória (Complexo I, Complexo II, Complexo IV) e níveis de ATP intracelular;
- e. Avaliação da atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase;
- f. Avaliação da modulação de fatores de transcrição e proteínas sinalizadoras relacionadas aos parâmetros bioquímicos avaliados.

CAPÍTULO II. *In vivo*

Avaliação do possível papel neuroprotetor do pré-tratamento com CoQ₁₀ frente às alterações causadas pela administração de QUIN no estriado de ratos Wistar jovens sobre:

- a. Parâmetros comportamentais através das tarefas de campo aberto, reconhecimento de objeto, teste de trave e pole vertical;
- b. Avaliações morfológicas através da marcação com violeta de cresil e imunofluorescência;
- c. Expressão gênica de enzimas relacionadas a parâmetros oxidativos: CAT, SOD, GPx;
- d. Expressão gênica de marcadores inflamatórios: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1;
- e. Imunoconteúdo de proteínas relacionadas: Nrf2 e p-Nf- κ B.

PARTE II

METODOLOGIA E RESULTADOS

A metodologia e os resultados são apresentados na forma de 2 capítulos. Os capítulos 1 e 2 são apresentados na forma de artigos científicos, os quais apresentam como base os modelos abaixo descritos:

Capítulo 1 (*ex vivo*):

Os animais de 30 dias de idade foram eutanasiados, seu cérebro dissecado e o corpo estriado fatiado. As fatias de 0,4 mm foram preparadas utilizando um equipamento McIlwain Tissue Chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd., England) e transferidas para uma placa de 24 poços contendo tampão Krebs-HEPES (composto por 124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 25 mM Na-HEPES e 12 mM glicose, pH 7.4) para manutenção das condições fisiológicas por 15 minutos.

Na etapa piloto, foi realizada uma curva de dose-resposta para a seleção da concentração de CoQ₁₀ a ser utilizada no estudo. Foram utilizadas as doses de 25, 50, 75 e 100 µM de CoQ₁₀, selecionadas a partir de estudos prévios (BUSANELLO et al., 2017; EGHBAL; ABDOLI; AZARMI, 2014; NOH et al., 2013; RUIZ-CONCA et al., 2017). Nas etapas experimentais seguintes, as fatias foram pré incubadas com CoQ₁₀ na concentração de 100 µM por 15 minutos, e posteriormente, co-incubadas com CoQ₁₀ e QUIN 100 µM (FERREIRA et al., 2018) por 30 minutos. As fatias correspondentes ao grupo controle foram incubadas em tampão Krebs-HEPES, formando assim quatro grupos de trabalho: (1) Controle (2)CoQ₁₀ (3) QUIN (4) CoQ₁₀+ QUIN.

Capítulo 2 (*in vivo*):

Pré-tratamento com CoQ₁₀: os animais receberam uma injeção intraperitoneal diária de CoQ₁₀ do 21º dia ao 30º dia de vida, na dose de 10 mg por quilograma de peso corporal do animal, segundo protocolo adaptado (RAUSCHER; SANDERS; WATKINS, 2001). Os animais controles receberam volume equivalente de cloreto de sódio 0,9%.

Administração intraestriatal de QUIN: os animais foram anestesiados com solução de Equitesina (contendo o anestésico barbitúrico tiopental e o sedativo hidrato de cloral, segundo protocolo adaptado (SCHUMACHER; SCHNEIDER; WOOLLEY, 2011)), na dose de 2,5mg por quilograma de peso corporal, via intraperitoneal. Após constatar que o animal estava anestesiado, o mesmo foi posicionado no aparelho estereotáxico do tipo Kopf. Foi realizada a assepsia local com álcool iodado, seguida de uma incisão longitudinal, a fim de expor a calota craniana. A localização estriatal exata para a administração foi baseada de acordo com o atlas de Paxinos (PAXINOS; WATSON, 2006). Foi realizada a administração de QUIN na concentração de 150 nM (PIEROZAN et al., 2014) e solução fosfato-salina no grupo controle.

CAPÍTULO 1:

Neurotoxicity Research
<https://doi.org/10.1007/s12640-022-00484-9>

ORIGINAL ARTICLE



Quinolinic Acid Impairs Redox Homeostasis, Bioenergetic, and Cell Signaling in Rat Striatum Slices: Prevention by Coenzyme Q₁₀

Fernanda Silva Ferreira^{1,2} · Tiago Marcon Dos Santos^{1,2} · Osmar Vieira Ramires Junior^{1,2} · Josiane Silva Silveira^{1,2} · Felipe Schmitz² · Angela T. S. Wyse^{1,2,3}

Received: 28 October 2021 / Revised: 15 February 2022 / Accepted: 21 February 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2022

Periódico: Neurotoxicity Research

Status: Publicado

DOI:10.1007/s12640-022-00484-9.

CAPÍTULO 2:

Behavioral, morphological and inflammatory/oxidative status changes caused by quinolinic acid in striatum of rodent: Protective effect of Coenzyme Q₁₀

Fernanda Silva Ferreira^{1,2}, Osmar Vieira Ramires Junior^{1,2}, Tiago Marcon dos Santos², Josiane Silva Silveira^{1,2}, Bruna Ferrary Deniz², Vinicius Santos Alves³, Robson Coutinho-Silva³, Luiz Eduardo Baggio Savio³, Angela T.S. Wyse^{1,2,4}

Status: a ser submetido

**Behavioral, morphological and inflammatory/oxidative status changes
caused by quinolinic acid in striatum of rodent: Protective effect of
Coenzyme Q₁₀**

**Fernanda Silva Ferreira^{1,2}, Osmar Vieira Ramires Junior^{1,2}, Tiago Marcon
dos Santos², Josiane Silva Silveira^{1,2}, Bruna Ferrary Deniz², Vinicius
Santos Alves³, Robson Coutinho-Silva³, Luiz Eduardo Baggio Savio³,
Angela T.S. Wyse^{1,2,4}**

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, ICBS, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.
2. Laboratório de Neuroproteção e Doenças Neurometabólicas, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.
3. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal Do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.
4. Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.

Address reprint requests to: Dr. Angela T.S. Wyse, Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil, Phone: 55 51 3308 5573, Fax: 55 51 3308 5535, E-mail: wyse@ufrgs.br

PARTE III

1. DISCUSSÃO

O ácido quinolínico é um composto tóxico formado em situações patológicas pela via das quinureninas (GUILLEMIN, 2012; JACOBS et al., 2017). O aumento na concentração de QUIN está relacionado a diversas doenças, como esquizofrenia, Alzheimer, Parkinson, Huntington, entre outras, e seus efeitos tóxicos estão relacionados a mecanismos de ação diversos, apresentando ação pró-oxidante, pró-inflamatória e causando excitotoxicidade (BEHAN et al., 1999; BRAIDY; GRANT, 2017; ERHARDT et al., 2013; KUBICOVA; HADACEK; CHOBOT, 2013; LUIS-GARCÍA et al., 2017). Diante da importância da ação tóxica QUIN em doenças neurodegenerativas, é importante encontrar substâncias capazes de prevenir suas ações deletérias no SNC. Neste contexto, a Coenzima Q₁₀ é uma substância presente nas mitocôndrias responsável por exercer efeitos benéficos no metabolismo celular. Na sua forma reduzida (ubiquinol), apresenta ação antioxidante, anti-apóptica, e anti-inflamatória (AASETH; ALEXANDER; ALEHAGEN, 2021; KOMAKI et al., 2019)

Na parte 1 do presente trabalho, foi avaliado o potencial protetor da CoQ₁₀ em fatias de estriado de ratos Wistar tratadas com QUIN. Inicialmente foi realizada uma curva de dose-resposta para avaliação da concentração de CoQ₁₀ com ação mais efetiva frente aos parâmetros estudados, utilizando quatro concentrações: 25, 50, 75 e 100 µM. A dose de QUIN (100 µM) foi baseada em estudos anteriores do grupo de pesquisa (FERREIRA et al., 2018). Para avaliações iniciais, foram realizadas as análises de oxidação de H₂DCF (que mensura a formação de espécies reativas de oxigênio), níveis de nitritos (avaliação indireta da formação de espécies reativas de nitrogênio) e atividade da enzima AChE, além da avaliação de viabilidade celular pela técnica de redução do MTT. Os tratamentos realizados não afetaram a

viabilidade celular, e observamos um aumento na oxidação de H₂DCF, nos níveis de nitritos e na atividade da AChE causado por QUIN. Os resultados encontrados corroboram estudos prévios que demonstram as ações de QUIN na manutenção de um estado oxidativo, com aumento na produção de ERO/ERN, acarretando danos celulares através de mecanismos de ação distintos (KUBICOVA; HADACEK; CHOBOT, 2013; LUGO-HUITRÓN et al., 2013). Além disso, o sistema colinérgico está relacionado a funções como transmissão nervosa, aprendizado e memória, além de seu papel como via anti-inflamatória. O aumento na atividade da AChE causado por QUIN pode estar relacionado a neuroinflamação, citotoxicidade e neurodegeneração (CRUZ; CARRILLO-MORA; SANTAMARÍA, 2013; GUILLEMIN, 2012; MISHRA; KUMAR, 2014). A concentração de CoQ₁₀ capaz de prevenir os danos causados por QUIN nas três análises realizadas foi 100 µM, sendo então a escolha para a realização das análises subsequentes.

Na avaliação das defesas antioxidantes, observa-se que a CoQ₁₀ preveniu de maneira parcial a alteração da razão SOD/CAT e do conteúdo de glutatona e de maneira total a diminuição da atividade da GPx causadas por QUIN. Os danos a biomoléculas foram analisados através dos níveis de TBARS, para mensurar peroxidação lipídica, e conteúdo de grupamentos sulfidrilas, para avaliação de danos proteicos, onde observamos alterações causadas por QUIN e um efeito protetor de CoQ₁₀ em relação aos níveis de TBARS. Reforçando estudos anteriores, observou-se que em conjunto com o aumento na oxidação de H₂DCF, QUIN leva a manutenção do estado pró-oxidante das células, pelo aumento na produção de ERO, danos a biomoléculas e diminuição do potencial antioxidante celular (FERREIRA et al., 2018; PÉREZ-DE LA CRUZ et al., 2005; SANTAMARÍA et al., 2001a). A ação protetora da CoQ₁₀ reforça suas características antioxidantes

anteriormente descritas. Dentro da mitocôndria, seu papel como acceptora de elétrons e a manutenção da dinâmica ubiquinol/ubiquinona é fundamental para manter os níveis de ERO baixos, sem geração de danos à organela e impedindo a peroxidação lipídica na membrana mitocondrial. Seus efeitos também são observados fora da mitocôndria, sendo responsável por prevenir a peroxidação lipídica de membranas biológicas, impedir a formação de radicais livres altamente reativos e pela regeneração do α -tocoferol. Ela também realiza sinalização intracelular que influencia a liberação de defesas antioxidantes enzimáticas e marcadores inflamatórios. Na molécula de DNA, a CoQ₁₀ também previne a oxidação e estimula a atividade das enzimas de reparação (CRANE; SUN; SUN, 1993; HARGREAVES; HEATON; MANTLE, 2020; PALLOTTI et al., 2022a).

A ação de QUIN sobre as enzimas da cadeia respiratória também foi analisada, demonstrando que a atividade dos complexos I, II e IV e os níveis de ATP encontram-se diminuídos. Nosso resultado corrobora estudos anteriores que demonstram que QUIN causa efeitos tóxicos sobre o metabolismo energético cerebral, aumentando a formação de radicais livres e levando a depleção de ATP (CRUZ; CARRILLO-MORA; SANTAMARÍA, 2013; LUIS-GARCÍA et al., 2017). CoQ₁₀ foi eficaz na proteção aos danos causados por QUIN em todos os parâmetros avaliados. Possivelmente, o pré-tratamento com CoQ₁₀ neutralizou os radicais livres formados por QUIN e foi capaz de manter a membrana mitocondrial íntegra, mantendo o funcionamento adequado da cadeia respiratória (BHARDWAJ; KUMAR, 2016; NOH et al., 2013).

Quanto à Na⁺,K⁺-ATPase, observou-se que o QUIN reduziu a atividade da enzima, a qual não foi prevenido pela CoQ₁₀. Essa enzima de membrana é responsável pela excitabilidade neuronal, mantendo o gradiente eletroquímico

celular, e pelo transporte de moléculas sinalizadoras e neurotransmissores. Ela é altamente suscetível a aumento de radicais livres, peroxidação lipídica e oxidação dos grupamentos sulfidrilas presentes em sua estrutura (LEES, 1991; WYSE et al., 2002). A inibição de sua atividade está relacionada a diversas patologias do SNC, como doenças neurodegenerativas, isquemia e erros inatos do metabolismo (DERGOUSOVA et al., 2017; SCHMITZ et al., 2016; SCHWEINBERGER et al., 2014; WYSE et al., 1999). Possivelmente, este resultado está correlacionado à diminuição do conteúdo de sulfidrilas também não prevenido pela CoQ₁₀, uma vez que a Na⁺,K⁺-ATPase possui grupamentos cisteína em seu sítio ativo, e com a oxidação dos grupamentos –SH há uma consequente oxidação irreversível dos resíduos de cisteína, causando danos enzimáticos (WYSE et al., 1999).

Finalizando o capítulo 1, o imunconteúdo de proteínas diretamente ligadas a regulação do metabolismo foi avaliado, tendo em vista que alterações em parâmetros oxidativos e energéticos acarretam alterações na sinalização celular. Foi possível observar a ação de QUIN sobre o conteúdo de Erk-1 total e de fosfo-Akt. Essas proteínas estão bastante ligadas à modulação do crescimento, da plasticidade e da sobrevivência celular, processos de memória e aprendizado (MULLONKAL; TOLEDO-PEREYRA, 2007; VANDRESEN-FILHO et al., 2015). Estudos anteriores demonstram que as ações de QUIN sobre essas proteínas levam a alterações oxidativas, do citoesqueleto celular e da captação de glutamato, entre outros (COLIN-GONZALEZ et al., 2013; FERREIRA et al., 2018; PIEROZAN et al., 2012; VANDRESEN-FILHO et al., 2016). CoQ₁₀ foi capaz de prevenir parcialmente a alteração de conteúdo da Erk-1. Esta proteína faz parte da família das MAPK (proteínas cinases ativadas por mitógenos), com papel importante em processos como expressão gênica, diferenciação e sobrevivência celular (SUN et al., 2015). O

efeito de CoQ₁₀ observado pode ser associado a suas ações antioxidantes, visto que a atividade enzimática pode ser prejudicada por radicais livres, e pela modulação de vias de sinalização como por exemplo, JNK/c-Jun/Bax, e outras proteínas envolvidas na plasticidade e sobrevivência celular já observadas em estudos anteriores (EL-AAL; EL-FATTAH; EL-ABHAR, 2017), demonstrando a importância desse componente no metabolismo celular.

No capítulo 2, o objetivo foi avaliar os efeitos *in vivo* da suplementação com CoQ₁₀ prévia à administração intraestriatal de QUIN, utilizando um modelo quimicamente induzido da Doença de Huntington Juvenil (PIEROZAN et al., 2014), avaliando parâmetros comportamentais, morfológicos, oxidativos e inflamatórios.

Inicialmente, foram realizadas tarefas para avaliações comportamentais. No teste de campo aberto avaliamos atividade locomotora e exploratória dos animais, além de características de comportamento do tipo ansioso (ARTENI et al., 2010; CRAWLEY; BAILEY, 2008). Observou-se que os animais tratados com QUIN apresentaram uma maior média de velocidade, distância percorrida e número de cruzamentos em relação aos animais controle. Além disso, ratos QUIN passaram menos tempo nos espaços periféricos do aparato do teste em relação tempo total quando comparados aos ratos controle. Estes resultados demonstram dificuldades de habituação dos animais ao aparato e comportamento com características ansiosas (SANCHES et al., 2013). Não houve diferença significativa na avaliação do tempo imóvel. O pré-tratamento com CoQ₁₀ demonstrou capacidade de proteger os animais dessas alterações, mantendo seu comportamento semelhante aos ratos controle.

Na sequência, as memórias de curto e longo prazo dos animais foram avaliadas utilizando o teste de reconhecimento de objetos (ENNACEUR;

DELACOUR, 1988). Analisando o tempo de exploração dos animais em cada objeto, observa-se que no treino todos os grupos estudados exploram os dois objetos apresentados por tempo semelhante. Já nos testes de 3 e 24 horas, observa-se que apenas o grupo QUIN explora os dois objetos por tempo semelhante e a partir disso, é possível inferir que os animais desse grupo apresentam comprometimento da memória. A representação dos dados no índice de discriminação (diferença entre o tempo de exploração do objeto novo e do tempo total de exploração) reforça essa hipótese, mostrando que o grupo QUIN apresenta diferença significativa do grupo controle em 3 e 24 horas de teste. Este efeito pode estar relacionado à ação de QUIN sobre os receptores NMDA, pois estes receptores estão diretamente envolvidos com a formação de memórias (SILVEIRA et al., 2022). A CoQ₁₀ apresentou efeito protetor sobre esse parâmetro, sendo que os animais que receberam o pré-tratamento apresentaram comportamento semelhante ao grupo controle nos dois tempos avaliados.

O *pole test* é um teste utilizado para avaliar bradicinesia (RAMIRES JÚNIOR et al., 2021), e observa-se que os animais tratados com QUIN apresentaram um tempo maior de latência para a virada e para a descida do aparato em relação aos animais controle. Esses resultados indicam danos que causam a lentidão de movimentos voluntários e é indicativo de problemas neurológicos (ACHENBACH et al., 2020). O pré-tratamento com CoQ₁₀ foi benéfico e os animais que o receberam apresentaram tempos semelhantes ao grupo controle.

No teste da trave de equilíbrio, que avalia coordenação motora fina, não se observou nenhuma alteração significativa.

Avaliados em conjunto, esses resultados demonstram que a administração de QUIN leva a alterações comportamentais importantes. Observa-se um declínio

importante na habituação dos animais, comportamento do tipo ansioso, alterações de memória a curto e a longo prazo e características de bradicinesia. O pré-tratamento com CoQ₁₀ demonstrou ser eficiente na prevenção dos danos comportamentais encontrados. O uso de CoQ₁₀ em doenças neurodegenerativas apresenta potencial protetor, possivelmente em razão da modulação da atividade de proteínas presentes em vias de plasticidade e sobrevivência celular (EL-AAL; EL-FATTAH; EL-ABHAR, 2017). Em estudo clínico anterior (SAWADDIRUK et al., 2019) os efeitos de CoQ₁₀ em pacientes com fibromialgia em uso de medicamento para dor intensa (pregabalina) foram avaliados. Na associação de CoQ₁₀ + pregabalina, houve diminuição dos danos oxidativos mitocondriais, inflamatórios e apoptóticos resultando em pacientes com score menor de dor e ansiedade, demonstrando que espécies reativas em excesso nas células podem estar diretamente relacionadas a alterações comportamentais. A suplementação com CoQ₁₀ também foi capaz de reverter comportamento do tipo depressivo em roedores (ANDALIB et al., 2019) bem como atenuou déficit motor observado em modelo pré-clínico de diabetes (OMIDI et al., 2019).

Para as avaliações morfológicas, utilizou-se a coloração de violeta de cresil, o qual cora a substância de Nissl em neurônios, e o anticorpo anti-GFAP (proteína glial fibrilar ácida), proteína do citoesqueleto característica de astrócitos. Apesar da toxicidade característica do QUIN, em nosso modelo ele não foi capaz de causar mudanças na quantidade de neurônios e astrócitos estriatais quando comparados ao grupo controle. Podemos, portanto, inferir que as alterações causadas por QUIN observadas no estudo são causadas por seus efeitos nas vias de sinalização celular e não pela diminuição de células viáveis no tecido. Além disso, o COQ₁₀ também não alterou o conteúdo celular avaliado.

Na avaliação da expressão gênica de marcadores inflamatórios, observa-se aumento significativo na expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e MCP-1 nos grupos tratados com QUIN. Estes resultados estão de acordo com as características pró-inflamatórias clássicas deste metabólito (BRAIDY; GRANT, 2017; LUIS-GARCÍA et al., 2017; TASSET et al., 2010). QUIN é um composto responsável pela manutenção de um ciclo pró-inflamatório no SNC (GUILLEMIN, 2012). A ativação de células inflamatórias, como microglia e macrófagos infiltrados, estimula o aumento da concentração de QUIN, e esse aumento na concentração leva a um aumento na ativação de células inflamatórias, além de agir em sinergia com outros compostos, como por exemplo, com as placas amilóides A β 1-42 gerando maior liberação de citocinas pró-inflamatórias na DA (WU et al., 2013).

No pré-tratamento com a COQ₁₀, observa-se prevenção total de alteração da IL-1 β e prevenção parcial da IL-6. Essas duas citocinas são mediadores clássicos de processos pró-inflamatórios, e seu aumento está diretamente relacionado à manutenção da inflamação, levando a alterações metabólicas e celulares, podendo causar apoptose. Devido à ação protetora do CoQ₁₀, possivelmente o estado pró-inflamatório e os danos celulares são reduzidos (AASETH; ALEXANDER; ALEHAGEN, 2021; ABIRI; VAFA, 2021; YOUSEF et al., 2019). Encontramos um aumento na expressão do gene da citocina anti-inflamatória IL-10 apenas no grupo CoQ₁₀ + QUIN.

O pré-tratamento com o CoQ₁₀ não foi capaz de impedir o aumento da expressão do gene TNF- α e MCP-1. É importante considerar que o TNF- α e o MCP-1, além de seus efeitos clássicos, também são considerados marcadores inflamatórios agudos, sendo responsáveis pelos processos de sinalização e recrutamento de proteínas e células para atuar no processo inflamatório, e pode-se

inferir que CoQ₁₀ mantém a expressão de mediadores inflamatórios agudos para o recrutamento de outras proteínas para reagir ao processo inflamatório instalado anteriormente (GHASEMLOO et al., 2021b; MOATTI; COHEN, 2021). Tomados em conjunto, os resultados das avaliações de expressão gênica dos marcadores inflamatórios confirmam a ação tóxica do QUIN, o que leva ao aumento da expressão de marcadores pró-inflamatórios clássicos (FERREIRA et al., 2020). Além disso, considerando todos os resultados envolvendo o CoQ₁₀, observamos que ele impede a expressão de citocinas pró-inflamatórias e também ativa a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10. Níveis elevados de IL-10, além de seu efeito antiinflamatório clássico, podem bloquear a expressão de IL-1 (YOUSEF et al., 2019), e seu aumento no grupo pré-tratado com o CoQ₁₀ reforça estudos anteriores que mostram o potencial anti-inflamatório desse composto, agindo como modulador da expressão de genes da cascata inflamatória e com efeitos já demonstrados em modelos de esclerose múltipla, isquemia cerebral e doenças neurodegenerativas (MOATTI; COHEN, 2021; NIKOLAEVNA et al., 2020; YOUSEF et al., 2019).

Observamos também uma diminuição no imunoconteúdo nuclear de p-nF- κ B no tratamento com QUIN. O NF- κ B é um importante fator de transcrição responsável pela modulação da expressão de proteínas relacionadas a processos inflamatórios, recrutamento, proliferação e sobrevivência celular. Uma diminuição no conteúdo desse fator pode estar relacionada à manutenção do estado inflamatório, uma vez que há uma diminuição na produção de proteínas e enzimas essenciais para o processo. Observamos a prevenção parcial no tratamento com CoQ₁₀, que pode estar relacionado a uma melhora nos processos de reação à inflamação e à sobrevivência celular (MOATTI; COHEN, 2021).

A expressão gênica de defesas antioxidantes enzimáticas também foi avaliada. A administração de QUIN alterou de forma significativa a expressão de CAT, SOD, e GPx, e este resultado corrobora seu papel tóxico com ação pró-oxidante (FERREIRA et al., 2018, 2020; KUBICOVA; HADACEK; CHOBOT, 2013; TASSET et al., 2010). Com o pré-tratamento com CoQ₁₀, observa-se prevenção na alteração da expressão da SOD e da GPx (AASETH; ALEXANDER; ALEHAGEN, 2021; FERREIRA et al., 2022; KOMAKI et al., 2019; PALLOTTI et al., 2022a). A diminuição da expressão de CAT não foi prevenida pela CoQ₁₀. Na avaliação do imunoconteúdo de Nrf2, observamos uma diminuição dos níveis citoplasmáticos na presença de QUIN, e esse efeito é prevenido pelo pré-tratamento com CoQ₁₀. Nrf2 é um importante fator de transcrição, responsável por estimular a expressão gênica de defesas antioxidantes e anti-inflamatórias (COLÍN-GONZÁLEZ et al., 2014; FERREIRA et al., 2018). A CoQ₁₀ está presente em todas as células do corpo humano, e suas maiores concentrações são encontradas em órgãos que necessitam de muita energia a partir do ATP formado na cadeia transportadora de elétrons, como cérebro, músculos e coração. Além disso, já se observou que apresenta efeito protetor maior do que outros antioxidantes lipossolúveis, como licopeno, β -caroteno e α -tocoferol (BENTINGER; BRISMAR; DALLNER, 2007). Nossos resultados corroboram vários estudos que já demonstraram este potencial antioxidante da CoQ₁₀ (ABIRI; VAFA, 2021).

Tomados em conjunto, os resultados do presente trabalho demonstram que a CoQ₁₀ possui potencial terapêutico, atuando na proteção contra os danos gerados pelo QUIN no estriado de ratos Wistar jovens. As doses de CoQ₁₀ utilizadas nas abordagens experimentais não causaram alteração na viabilidade celular e apresentaram efeitos positivos sobre parâmetros comportamentais, oxidativos,

energéticos, inflamatórios e de sinalização celular. Com os resultados encontrados e estudos anteriores sobre este composto, podemos inferir que seu efeito protetor é resultado principalmente da sua característica antioxidante, porém são necessários estudos mais aprofundados sobre o tema para elucidar os mecanismos de ação envolvidos.

2. CONCLUSÃO

Os resultados da presente tese permitem concluir que:

CAPÍTULO 1:

O tratamento com QUIN nas fatias de estriado de ratos jovens causou danos oxidativos, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio e os níveis de nitritos, alterando a razão das enzimas SOD/CAT e diminuindo a atividade da enzima GPx. Além disso, houve redução no conteúdo de glutathiona e sulfidrilas e aumento nos níveis de TBARS. Também causou danos ao metabolismo energético, reduzindo a atividades dos complexos mitocondriais I, II e IV e os níveis de ATP intracelular. QUIN aumentou a atividade da enzima AChE e diminuiu a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase, além de alterar o imunoc conteúdo da proteína Erk-1.

A administração de CoQ₁₀ foi capaz de prevenir o aumento de espécies reativas de oxigênio, dos níveis de nitritos, da atividade da enzima AChE e dos níveis de TBARS. A redução da atividade da GPx, da atividade dos complexos mitocondriais I, II e IV e dos níveis de ATP também foram prevenidos pelo pré-tratamento com CoQ₁₀. De maneira parcial, a CoQ₁₀ preveniu a alteração da razão SOD/CAT e do imunoc conteúdo de Erk-1 e a redução do conteúdo de glutathiona.

O tratamento com CoQ₁₀ + QUIN em fatias de ratos Wistar jovens reduziu o imunoc conteúdo de fosfo-Akt.

CAPÍTULO 2:

A administração intraestriatal de QUIN em ratos Wistar machos jovens alterou parâmetros comportamentais, avaliados nos testes de campo aberto, reconhecimento de objetos e *pole test*. Aumentou a expressão gênica dos marcadores inflamatórios TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1. Diminuiu a expressão gênica das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx e diminuiu o imunocontéudo da fração citoplasmática de Nrf2 e da fração nuclear de p-Nf- κ B.

O **pré-tratamento com CoQ₁₀** preveniu as alterações encontradas nos testes de campo aberto, reconhecimento de objetos e *pole test*. Também preveniu o aumento na expressão de IL-1 β e parcialmente o aumento na expressão de IL-6. CoQ₁₀ ainda aumentou a expressão de TNF- α , MCP-1 e IL-10, e preveniu alterações na expressão de SOD e GPx, no imunocontéudo de Nrf2 preveniu de forma parcial a alteração no imunocontéudo de p-Nf- κ B.

Em conjunto, os resultados dos dois modelos de estudo apresentados neste trabalho mostram que CoQ₁₀ preveniu, total ou parcialmente, a maioria dos testes comportamentais e bioquímicos (oxidativos, energéticos, inflamatórios e de sinalização celular) causadas pelo QUIN, sugerindo que a suplementação com CoQ₁₀ apresenta um potencial benéfico frente a desordens que acumulam QUIN, como por exemplo nas doenças neurodegenerativas, porém são necessários mais estudos a fim de determinar seus efeitos in vivo e os parâmetros de tratamento.

3. PERSPECTIVAS

Parte I. *Ex vivo*

- a. Ensaio Cometa;
- b. Vias de sinalização relacionadas: Western Blotting.
- c. Avaliação de parâmetros inflamatórios por Multiplex®
- d. Avaliação do papel de receptores NMDA mediante o uso de seu inibidor específico (MK-801)

Parte II. *In vivo*

- a. Avaliar por cromatografia líquida de alta eficiência os níveis séricos e estriatais de CoQ₁₀;
- b. Captação de glutamato e imunoconteúdo dos receptores GLAST e GLT-1;
- c. Vias de sinalização associadas as alterações oxidativas e inflamatórias encontradas;
- d. Parâmetros relacionados à função mitocondrial, como: massa mitocondrial e potencial de membrana e proteínas relacionadas à dinâmica mitocondrial.

4. APOIO FINANCEIRO

Este estudo foi financiado pelo Edital Universal/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), INCT (EN 465671/2014-4)/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Brasil, e PRONEX(16/2551-0000465-0)/Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) – Brasil.

5. REFERÊNCIAS

AASETH, J.; ALEXANDER, J.; ALEHAGEN, U. Coenzyme Q10 supplementation – In ageing and disease. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 197, n. April, p. 111521, 2021.

ABIRI, B.; VAFA, M. **Impact of coenzyme Q10 on inflammatory biomarkers and its role in future therapeutic strategies****Clinical Nutrition ESPEN**, 2021.

ACHENBACH, J. et al. Clinical manifestation of juvenile and pediatric hd patients: A retrospective case series. **Brain Sciences**, 2020.

ALBIN, R. L. et al. Cholinergic systems, attentional-motor integration, and cognitive control in Parkinson's disease. In: **Progress in Brain Research**. [s.l.: s.n.].

ALEN, N. V. **The cholinergic anti-inflammatory pathway in humans: State-of-the-art review and future directions****Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2022.

ANDALIB, S. et al. Coenzyme Q 10 Alleviated Behavioral Dysfunction and Bioenergetic Function in an Animal Model of Depression. **Neurochemical Research**, v. 44, n. 5, p. 1182–1191, 2019.

ANTUNES WILHELM, E. et al. Correlations between behavioural and oxidative parameters in a rat quinolinic acid model of Huntington's disease: Protective effect of melatonin. **European Journal of Pharmacology**, v. 701, n. 1–3, p. 65–72, 2013a.

ANTUNES WILHELM, E. et al. Correlations between behavioural and oxidative parameters in a rat quinolinic acid model of Huntington's disease: Protective effect of melatonin. **European Journal of Pharmacology**, v. 701, n. 1–3, p. 65–72, 2013b.

APERIA, A. **New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an**

interesting drug target. Journal of Internal Medicine. **Anais...**2007.

ARTENI, N. S. et al. Lateralized and sex-dependent behavioral and morphological effects of unilateral neonatal cerebral hypoxia-ischemia in the rat. **Behavioural Brain Research**, 2010.

BADAWY, A. A. B. **Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects**International Journal of Tryptophan Research, 2017.

BAIRD, L.; YAMAMOTO, M. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. **Molecular and Cellular Biology**, 2020.

BEHAN, W. M. et al. Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl. **British journal of pharmacology**, v. 128, n. 8, p. 1754–1760, 1999.

BELLEZZA, I. et al. **Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress**Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research, 2018.

BENTINGER, M.; BRISMAR, K.; DALLNER, G. The antioxidant role of coenzyme Q. **Mitochondrion**, 2007.

BHARDWAJ, M.; KUMAR, A. Neuroprotective mechanism of Coenzyme Q10 (CoQ10) against PTZ induced kindling and associated cognitive dysfunction: Possible role of microglia inhibition. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 6, p. 1301–1311, 2016.

BIASIBETTI-BRENDLER, H. et al. Hypoxanthine Induces Neuroenergetic Impairment and Cell Death in Striatum of Young Adult Wistar Rats. **Molecular Neurobiology**, p. 1–9, 2017.

BRAIDY, N. et al. Neuroprotective effects of naturally occurring polyphenols on quinolinic acid-induced excitotoxicity in human neurons. **FEBS Journal**, v. 277, n. 2, p. 368–382, 2010.

BRAIDY, N.; GRANT, R. **Kynurenine pathway metabolism and neuroinflammatory disease** *Neural Regeneration Research*, 2017.

BUSANELLO, E. N. B. et al. Pravastatin chronic treatment sensitizes hypercholesterolemic mice muscle to mitochondrial permeability transition: Protection by creatine or coenzyme Q10. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. APR, 2017.

CARTER, R. J.; MORTON, J.; DUNNETT, S. B. Motor Coordination and Balance in Rodents. In: **Current Protocols in Neuroscience**. [s.l: s.n.].

CIAPAŁA, K.; MIKA, J.; ROJEWSKA, E. **The kynurenine pathway as a potential target for neuropathic pain therapy design: From basic research to clinical perspectives** *International Journal of Molecular Sciences*, 2021.

COLIN-GONZALEZ, A. et al. Heme Oxygenase-1 (Ho-1) Upregulation Delays Morphological and Oxidative Damage Induced in an Excitotoxic / Pro-Oxidant Model in the Rat Striatum. **Neuroscience**, v. 231, p. 91–101, 2013.

COLÍN-GONZÁLEZ, A. L. et al. Early modulation of the transcription factor Nrf2 in rodent striatal slices by quinolinic acid, a toxic metabolite of the kynurenine pathway. **Neuroscience**, v. 260, p. 130–139, 2014.

COLLE, D. et al. Probucol modulates oxidative stress and excitotoxicity in Huntington's disease models in vitro. **Brain Research Bulletin**, v. 87, n. 4–5, p. 397–405, 2012.

COLTON, C. A. **Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain***Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 2009.

CORNELIUS, N. et al. Evidence of oxidative stress and mitochondrial dysfunction in spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) patient fibroblasts: Effect of coenzyme Q10 supplementation on these parameters. *Mitochondrion*, v. 34, p. 103–114, 2017.

CRANE, F. L.; SUN, I. L.; SUN, E. E. The essential functions of coenzyme Q. *The Clinical Investigator*, 1993.

CRAWLEY, J.; BAILEY, K. Anxiety-Related Behaviors in Mice. In: [s.l: s.n.].

CRUZ, V. P. D. LA; CARRILLO-MORA, P.; SANTAMARÍA, A. **Quinolinic acid, an endogenous molecule combining excitotoxicity, oxidative stress and other toxic mechanisms***International Journal of Tryptophan Research*, 2013.

DAS SARMA, J. **Microglia-mediated neuroinflammation is an amplifier of virus-induced neuropathology***Journal of NeuroVirology*, 2014.

DENIZ, B. F. et al. Folic acid supplementation during pregnancy prevents cognitive impairments and BDNF imbalance in the hippocampus of the offspring after neonatal hypoxia-ischemia. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2018.

DERGOUSOVA, E. A. et al. Effect of reduction of redox modifications of cys-residues in the Na,K-ATPase α 1-subunit on its activity. *Biomolecules*, v. 7, n. 1, 2017.

DI MEO, S.; VENDITTI, P. **Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants***Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.

DJEMIL, S.; SAMES, A. M.; PAK, D. T. S. ACh Transfers: Homeostatic Plasticity of Cholinergic Synapses. *Cellular and Molecular Neurobiology*, n. 0123456789,

2022.

DUMONT, M. et al. Coenzyme Q10 decreases amyloid pathology and improves behavior in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 27, n. 1, p. 211–23, 2011.

EGHBAL, M. A.; ABDOLI, N.; AZARMI, Y. Efficiency of hepatocyte pretreatment with coenzyme Q10 against statin toxicity. **Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju**, v. 65, n. 1, p. 101–108, 2014.

EL-AAL, S. A. A.; EL-FATTAH, M. A. A.; EL-ABHAR, H. S. CoQ10 augments rosuvastatin neuroprotective effect in a model of global ischemia via inhibition of NF- κ B/JNK3/Bax and activation of Akt/FOXO3A/Bim cues. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. OCT, 2017.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one - trial test for neurobiological studies of memory in rats . 1 " Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, p. 47–59, 1988.

ERHARDT, S. et al. Connecting inflammation with glutamate agonism in suicidality. **Neuropsychopharmacology**, 2013.

FERREIRA, F. S. et al. Kynurenic Acid Restores Nrf2 Levels and Prevents Quinolinic Acid-Induced Toxicity in Rat Striatal Slices. **Molecular Neurobiology**, p. 1–12, 2018.

FERREIRA, F. S. et al. Intrastratial Quinolinic Acid Administration Impairs Redox Homeostasis and Induces Inflammatory Changes: Prevention by Kynurenic Acid. **Neurotoxicity Research**, 2020.

FERREIRA, F. S. et al. Quinolinic Acid Impairs Redox Homeostasis, Bioenergetic,

and Cell Signaling in Rat Striatum Slices: Prevention by Coenzyme Q10. **Neurotoxicity Research**, n. 0123456789, 2022.

FOUCAULT-FRUCHARD, L. et al. Alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor agonist treatment in a rat model of Huntington's disease and involvement of heme oxygenase-1. **Neural Regeneration Research**, 2018.

FUJIGAKI, H.; YAMAMOTO, Y.; SAITO, K. **L-Tryptophan-kynurenine pathway enzymes are therapeutic target for neuropsychiatric diseases: Focus on cell type differences****Neuropharmacology**, 2017.

GHASEMLOO, E. et al. Neuroprotective effects of coenzyme Q10 in Parkinson's model via a novel Q10/miR-149-5p/MMPs pathway. **Metabolic Brain Disease**, v. 36, n. 7, p. 2089–2100, 2021a.

GHASEMLOO, E. et al. The neuroprotective effect of MicroRNA-149-5p and coenzymeQ10 by reducing levels of inflammatory cytokines and metalloproteinases following focal brain ischemia in rats. **Brain Research Bulletin**, 2021b.

GOLDSTEIN, I. et al. Involvement of Na⁺, K⁺-ATPase and Endogenous Digitalis-Like Compounds in Depressive Disorders. **Biological Psychiatry**, v. 60, n. 5, p. 491–499, 2006.

GUIDETTI, P. et al. Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 17, n. 3, p. 455–461, 2004.

GUILLEMIN, G. J. et al. A beta 1-42 induces production of quinolinic acid by human macrophages and microglia. **Neuroreport**, 2003.

GUILLEMIN, G. J. **Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin***FEBS Journal*, 2012.

GUILLEMIN, G. J.; KERR, S. J.; BREW, B. J. **Involvement of quinolinic acid in aids dementia complex***Neurotoxicity Research*, 2005.

GULAJ, E. et al. Kynurenine and its metabolites in Alzheimer's disease patients. **Advances in Medical Sciences**, 2010.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition reviews**, v. 52, n. 8, p. 253–265, 1994.

HALLIWELL, B. **Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life***Plant Physiology*, 2006.

HALLIWELL, B. **Free radicals and antioxidants - Quo vadis?***Trends in Pharmacological Sciences*, 2011.

HAN, B.; LI, X.; HAO, J. **The cholinergic anti-inflammatory pathway: An innovative treatment strategy for neurological diseases***Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2017.

HARGREAVES, I.; HEATON, R. A.; MANTLE, D. **Disorders of human coenzyme q10 metabolism: An overview***International Journal of Molecular Sciences*, 2020.

HEMAGIRRI, M.; SASIDHARAN, S. Biology of aging: Oxidative stress and RNA oxidation. **Molecular Biology Reports**, 2022.

HOLMSTRÖM, K. M.; KOSTOV, R. V.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T. The multifaceted role of Nrf2 in mitochondrial function. **Current Opinion in Toxicology**, v. 2, p. 80–91, 2017.

HOSOI, R. et al. Evaluation of intracellular processes in quinolinic acid-induced brain damage by imaging reactive oxygen species generation and mitochondrial complex I activity. **EJNMMI Research**, 2021.

HUANG, M. et al. Mechanistic Insight into Diosmin-Induced Neuroprotection and Memory Improvement in Intracerebroventricular-Quinolinic Acid Rat Model: Resurrection of Mitochondrial Functions and Antioxidants. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2022, 2022.

HUSSAIN BHAT, A. et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v. 74, p. 101–110, 2015.

JACOBS, K. R. et al. Major Developments in the Design of Inhibitors along the Kynurenine Pathway. **Current Medicinal Chemistry**, 2017.

JAMWAL, S. et al. L-theanine prevent quinolinic acid induced motor deficit and striatal neurotoxicity: Reduction in oxido-nitrosative stress and restoration of striatal neurotransmitters level. **European Journal of Pharmacology**, v. 811, n. June, p. 171–179, 2017.

JEON, S. W.; KIM, Y.-K. Inflammation-induced depression: Its pathophysiology and therapeutic implications. **Journal of Neuroimmunology**, v. 313, n. October, p. 92–98, 2017.

KALONIA, H.; KUMAR, P.; KUMAR, A. Attenuation of proinflammatory cytokines and apoptotic process by verapamil and diltiazem against quinolinic acid induced Huntington like alterations in rats. **Brain Research**, v. 1372, p. 115–126, 2011.

KALONIA, H.; MISHRA, J.; KUMAR, A. Targeting neuro-inflammatory cytokines and

oxidative stress by minocycline attenuates quinolinic-acid-induced huntington's disease-like symptoms in rats. **Neurotoxicity Research**, v. 22, n. 4, p. 310–320, 2012.

KAPLAN, J. H. Biochemistry of Na,K-ATPase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, n. 1, p. 511–535, 2002.

KINOSHITA, P. F. et al. **The Janus face of ouabain in Na⁺/K⁺-ATPase and calcium signalling in neurons***British Journal of Pharmacology*, 2022.

KOMAKI, H. et al. Investigation of protective effects of coenzyme Q10 on impaired synaptic plasticity in a male rat model of Alzheimer's disease. **Brain Research Bulletin**, v. 147, n. January, p. 14–21, 2019.

KOTLAR, I. et al. Anandamide Reduces the Toxic Synergism Exerted by Quinolinic Acid and Glutaric Acid in Rat Brain Neuronal Cells. **Neuroscience**, 2019.

KUBICOVA, L.; HADACEK, F.; CHOBOT, V. Quinolinic acid: Neurotoxin or oxidative stress modulator? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 11, p. 21328–21338, 2013.

KUMAR, A. et al. **Role of coenzyme Q10 (CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome***Pharmacology and Therapeutics*, 2009.

LEES, G. J. **Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology***Brain Research Reviews*, 1991.

LIANG, Y. et al. **Kynurenine Pathway Metabolites as Biomarkers in Alzheimer's**

DiseaseDisease Markers, 2022.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LUCAS, S.-M.; ROTHWELL, N. J.; GIBSON, R. M. The role of inflammation in CNS injury and disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. S1, p. S232–S240, 2006.

LUGO-HUITRÓN, R. et al. On the antioxidant properties of kynurenic acid: Free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 33, n. 5, p. 538–547, 2011.

LUGO-HUITRÓN, R. et al. Quinolinic acid: An endogenous neurotoxin with multiple targets. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 2013.

LUIS-GARCÍA, E. R. et al. Sulforaphane prevents quinolinic acid-induced mitochondrial dysfunction in rat striatum. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 31, n. 2, 2017.

MAES, M. et al. **The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: Leads for future research and new drug developments in depression****Metabolic Brain Disease**, 2009.

MARCHEGGIANI, F. et al. Anti-ageing effects of ubiquinone and ubiquinol in a senescence model of human dermal fibroblasts. **Free Radical Biology and Medicine**, 2021.

MAZAT, J. P.; DEVIN, A.; RANSAC, S. **Modelling mitochondrial ROS production by the respiratory chain****Cellular and Molecular Life Sciences**, 2020.

MEHTA, A. K.; GRACIAS, D. T.; CROFT, M. TNF activity and T cells. **Cytokine**, 2018.

MEYER, A. et al. **Mitochondria: An organelle of bacterial origin controlling inflammation** **Frontiers in Immunology**, 2018.

MISHRA, J.; KUMAR, A. Improvement of Mitochondrial Function by Paliperidone Attenuates Quinolinic Acid-Induced Behavioural and Neurochemical Alterations in Rats: Implications in Huntington's Disease. **Neurotoxicity Research**, v. 26, n. 4, p. 363–381, 2014.

MOATTI, A.; COHEN, J. L. **The TNF- α /TNFR2 Pathway: Targeting a Brake to Release the Anti-tumor Immune Response** **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, 2021.

MOLLAZADEH, H. et al. **Effects of statins on mitochondrial pathways** **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, 2021.

MONZIO COMPAGNONI, G. et al. **The Role of Mitochondria in Neurodegenerative Diseases: the Lesson from Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease** **Molecular Neurobiology**, 2020.

MOR, A. et al. **Role of kynurenine pathway in oxidative stress during neurodegenerative disorders** **Cells**, 2021.

MUKAI, K. et al. **Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors** **Immunological Reviews**, 2018.

MULERO, M. C.; HUXFORD, T.; GHOSH, G. NF- κ B, I κ B, and IKK: Integral components of immune system signaling. In: **Advances in Experimental Medicine**

and Biology. [s.l: s.n.].

MULLONKAL, C. J.; TOLEDO-PEREYRA, L. H. **Akt in ischemia and reperfusion** *Journal of Investigative Surgery*, 2007.

NIKOLAEVNA, O. O. et al. Intravenous administration of coenzyme q10 in acute period of cerebral ischemia decreases mortality by reducing brain necrosis and limiting its increase within 4 days in rat stroke model. **Antioxidants**, 2020.

NITURE, S. K.; KHATRI, R.; JAISWAL, A. K. **Regulation of Nrf2 - An update** *Free Radical Biology and Medicine*, 2014.

NOH, Y. H. et al. Inhibition of oxidative stress by coenzyme Q10 increases mitochondrial mass and improves bioenergetic function in optic nerve head astrocytes. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 10, 2013.

OGAWA, H. et al. Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na⁺,K⁺-ATPase) with bound potassium and ouabain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 33, p. 13742–13747, 2009.

OKUDAN, N.; BELVIRANLI, M.; SEZER, T. Potential Protective Effect of Coenzyme Q10 on Doxorubicin-Induced Neurotoxicity and Behavioral Disturbances in Rats. **Neurochemical Research**, v. 47, n. 5, p. 1280–1289, 2022.

OMIDI, G. et al. Effect of coenzyme Q10 supplementation on diabetes induced memory deficits in rats. **Metabolic Brain Disease**, 2019.

PALLOTTI, F. et al. **The roles of coenzyme Q in disease: Direct and indirect involvement in cellular functions** *International Journal of Molecular Sciences*, 2022a.

PALLOTTI, F. et al. The Roles of Coenzyme Q in Disease : Direct and Indirect Involvement in Cellular Functions. 2022b.

PAMPLONA, F. A. et al. Environmental enrichment improves cognitive deficits in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR): Relevance for Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 7, p. 1153–1160, 2009.

PAVLOV, V. et al. Levels Through the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway. **Brain Behav Immun**, v. 23, n. 1, p. 41–45, 2009.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. The cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 19, p. 493–499, 2005.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Sixth Edition by. **Academic press**, v. 170, p. 547612, 2006.

PÉREZ-DE LA CRUZ, V. et al. Excitotoxic brain damage involves early peroxynitrite formation in a model of Huntington's disease in rats: Protective role of iron porphyrinate 5,10,15,20-tetrakis (4-sulfonatophenyl)porphyrinate iron (III). **Neuroscience**, v. 135, n. 2, p. 463–474, 2005.

PÉREZ-DE LA CRUZ, V. et al. Targeting oxidative/nitrogenic stress ameliorates motor impairment, and attenuates synaptic mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in two models of Huntington's disease. **Behavioural Brain Research**, 2009.

PERRY, E. et al. **Acetylcholine in mind: A neurotransmitter correlate of consciousness?** **Trends in Neurosciences**, 1999.

PIEROZAN, P. et al. Signaling mechanisms downstream of quinolinic acid targeting

the cytoskeleton of rat striatal neurons and astrocytes. **Experimental Neurology**, v. 233, n. 1, p. 391–399, 2012.

PIEROZAN, P. et al. Biochemical, histopathological and behavioral alterations caused by intrastriatal administration of quinolic acid to young rats. **FEBS Journal**, v. 281, n. 8, p. 2061–2073, 2014.

PIRES, A. S. et al. **Recent advances in clinical trials targeting the kynurenine pathway****Pharmacology and Therapeutics**, 2022.

POPRAC, P. et al. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 7, p. 592–607, 2017.

PURUSHOTHAMAN, B.; SUMATHI, T. 5,6,7 trihydroxy flavone armoured neurodegeneration caused by Quinolinic acid induced huntington's like disease in rat striatum - reinstating the level of brain neurotrophins with special reference to cognitive-socio behaviour, biochemical and histopathol. **Neuroscience Research**, 2022.

RAHAL, A. et al. **Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay****BioMed Research International**, 2014.

RAMIRES JÚNIOR, O. V. et al. Nanoemulsion Improves the Neuroprotective Effects of Curcumin in an Experimental Model of Parkinson's Disease. **Neurotoxicity Research**, 2021.

RAMOS-MARTÍNEZ, I. E. et al. **Role of the cholinergic anti-inflammatory reflex in central nervous system diseases****International Journal of Molecular Sciences**, 2021.

RAUCHOVÁ, H. Coenzyme Q10 Effects in Neurological Diseases. **Physiological Research**, 2021.

RAUSCHER, F. M.; SANDERS, R. A.; WATKINS, J. B. Effects of coenzyme Q10 treatment on antioxidant pathways in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 15, n. 1, p. 41–46, 2001.

ROSAS-BALLINA, M.; TRACEY, K. J. **Cholinergic control of inflammation**. Journal of Internal Medicine. **Anais...**2009.

RUIZ-CONCA, M. et al. Coenzyme Q10 supplementation during in vitro maturation of bovine oocytes (*Bos taurus*) helps to preserve oocyte integrity after vitrification. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 52–54, 2017.

SAHA, S. et al. **An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation Molecules (Basel, Switzerland)**, 2020.

SALAMA, A.; ELGOHARY, R. L-carnitine and Co Q10 ameliorate potassium dichromate -induced acute brain injury in rats targeting AMPK/AKT/NF- κ B. **International Immunopharmacology**, 2021.

SANCHES, E. F. et al. Early hypoxia-ischemia causes hemisphere and sex-dependent cognitive impairment and histological damage. **Neuroscience**, v. 237, p. 208–215, 2013.

SANTAMARÍA, A. et al. In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. **NeuroReport**, v. 12, n. 12, p. 2693–2696, 2001a.

SANTAMARÍA, A. et al. Quinolinic acid induces oxidative stress in rat brain

synaptosomes. **NeuroReport**, v. 12, n. 4, p. 871–874, 2001b.

SARTER, M.; BRUNO, J. P. **Cognitive functions of cortical acetylcholine: Toward a unifying hypothesis****Brain Research Reviews**, 1997.

SAS, K. et al. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 257, n. 1–2, p. 221–239, 2007.

SAS, K.; SZABÓ, E.; VÉCSEI, L. **Mitochondria, oxidative stress and the kynurenine system, with a focus on ageing and neuroprotection****Molecules**, 2018.

SAWADDIRUK, P. et al. Coenzyme Q10 supplementation alleviates pain in pregabalin-treated fibromyalgia patients via reducing brain activity and mitochondrial dysfunction. **Free Radical Research**, 2019.

SCHERER, E. B. S. et al. Mild Hyperhomocysteinemia Increases Brain Acetylcholinesterase and Proinflammatory Cytokine Levels in Different Tissues. **Molecular Neurobiology**, v. 50, n. 2, p. 589–596, 2014.

SCHMITZ, F. et al. Chronic Treatment with a Clinically Relevant Dose of Methylphenidate Increases Glutamate Levels in Cerebrospinal Fluid and Impairs Glutamatergic Homeostasis in Prefrontal Cortex of Juvenile Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 4, p. 2384–2396, 2016.

SCHUMACHER, J. W.; SCHNEIDER, D. M.; WOOLLEY, S. M. N. Anesthetic state modulates excitability but not spectral tuning or neural discrimination in single auditory midbrain neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 106, n. 2, p. 500–514, 2011.

SCHWARCZ, R.; STONE, T. W. The kynurenine pathway and the brain: Challenges, controversies and promises. **Neuropharmacology**, v. 112, p. 237–247, 2017.

SCHWEINBERGER, B. M. et al. Development of an animal model for gestational hypermethioninemia in rat and its effect on brain Na⁺,K⁺-ATPase/Mg²⁺-ATPase activity and oxidative status of the offspring. **Metabolic brain disease**, v. 29, n. 1, p. 153–60, 2014.

SEGABINAZI, E. et al. Comparative overview of the effects of aerobic and resistance exercise on anxiety-like behavior, cognitive flexibility, and hippocampal synaptic plasticity parameters in healthy rats. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, 2020.

SHARIFI, M. H. et al. Effects of a therapeutic lifestyle change diet and supplementation with Q10 plus L-carnitine on quality of life in patients with myocardial infarction: A randomized clinical trial. **Tabriz University of Medical Sciences**, v. 7, n. 1, p. 113–117, 2015.

SHARMA, S. K.; EL REFAEY, H.; EBADI, M. Complex-1 activity and 18F-DOPA uptake in genetically engineered mouse model of Parkinson's disease and the neuroprotective role of coenzyme Q10. **Brain research bulletin**, v. 70, n. 1, p. 22–32, 2006.

SHRIVASTAVA, A. N.; TRILLER, A.; MELKI, R. **Cell biology and dynamics of Neuronal Na⁺/K⁺-ATPase in health and diseases****Neuropharmacology**, 2020.

SILVEIRA, J. S. et al. Folic acid supplementation during pregnancy alters behavior in male rat offspring: oxidative stress and neuroinflammatory implications. **Molecular Neurobiology**, 2022.

SINGH, A. et al. **Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases***Molecules*, 2019.

SINGH, S.; ANSHITA, D.; RAVICHANDIRAN, V. **MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease***International Immunopharmacology*, 2021.

SOUSA, J. S.; D'IMPRIMA, E.; VONCK, J. Mitochondrial respiratory chain complexes. In: **Subcellular Biochemistry**. [s.l: s.n.].

SPINDLER, M.; FLINT BEAL, M.; HENCHCLIFFE, C. **Coenzyme Q10 effects in neurodegenerative disease***Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2009.

STONE, T. W. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. **Pharmacological reviews**, v. 45, p. 309–379, 1993.

SUN, N.; YOULE, R. J.; FINKEL, T. **The Mitochondrial Basis of Aging***Molecular Cell*, 2016.

SUN, S. C. **The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation***Nature Reviews Immunology*, 2017.

SUN, Y. et al. **Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis***Journal of Receptors and Signal Transduction*, 2015.

TASSET, I. et al. Protective effect of tert-butylhydroquinone on the quinolinic-acid-induced toxicity in rat striatal slices: Role of the Nrf2-antioxidant response element pathway. **NeuroSignals**, v. 18, n. 1, p. 24–31, 2010.

TAVARES, R. G. et al. Quinolinic acid-induced seizures stimulate glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain: Effects prevented by guanine-based purines.

Neurochemical Research, v. 33, n. 1, p. 97–102, 2008.

VANDRESEN-FILHO, S. et al. Cerebral cortex, hippocampus, striatum and cerebellum show differential susceptibility to quinolinic acid-induced oxidative stress.

Neurological Sciences, v. 36, n. 8, p. 1449–1456, 2015.

VANDRESEN-FILHO, S. et al. Atorvastatin Prevents Glutamate Uptake Reduction Induced by Quinolinic Acid Via MAPKs Signaling. **Neurochemical Research**, 2016.

VARFOLOMEEV, E.; VUCIC, D. Intracellular regulation of TNF activity in health and disease. **Cytokine**, 2018.

VENKATESAN, D. et al. **Kynurenine pathway in Parkinson's disease—An update** **NeurologicalSci**, 2020.

WANG, H. et al. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature**, 2003.

WAUGH, D. T. Fluoride exposure induces inhibition of sodium-and potassium-activated adenosine triphosphatase (Na^+ , k^+ -atpase) enzyme activity: Molecular mechanisms and implications for public health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 2019.

WILKINS, H. M.; MORRIS, J. K. New Therapeutics to Modulate Mitochondrial Function in Neurodegenerative Disorders. **Current pharmaceutical design**, v. 23, n. 5, p. 731–752, 2017.

WIPRICH, M. T.; BONAN, C. D. **Purinergic Signaling in the Pathophysiology and Treatment of Huntington's Disease** **Frontiers in Neuroscience**, 2021.

WU, W. et al. Expression of Tryptophan 2,3-Dioxygenase and Production of

Kynurenine Pathway Metabolites in Triple Transgenic Mice and Human Alzheimer's Disease Brain. **PLoS ONE**, 2013.

WYSE, A. T. S. et al. Alanine prevents the decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity in experimental phenylketonuria. **Metabolic Brain Disease**, v. 14, n. 2, p. 95–101, 1999.

WYSE, A. T. S. et al. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATpase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. **Neurochemical Research**, v. 27, n. 12, p. 1685–1689, 2002.

XANTHOS, D. N.; SANDKÜHLER, J. **Neurogenic neuroinflammation: Inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity**Nature Reviews Neuroscience, 2014.

YANAGISAWA, N. **Functions and dysfunctions of the basal ganglia in humans**Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences, 2018.

YOUSEF, A. O. S. et al. The neuroprotective role of coenzyme Q10 against lead acetate-induced neurotoxicity is mediated by antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic activities. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 2019.

ZHANG, C. **The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction**Basic Research in Cardiology, 2008.

ZHANG, J. M.; AN, J. **Cytokines, inflammation, and pain**International Anesthesiology Clinics, 2007.

ZHU, Z.-G. et al. The efficacy and safety of coenzyme Q10 in Parkinson's disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Neurological sciences: official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology**, p. 215–224, 2016.

ZONG, B. et al. Understanding How Physical Exercise Improves Alzheimer's Disease: Cholinergic and Monoaminergic Systems. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 14, n. May, p. 1–25, 2022.

6. ANEXOS

6.1 Carta de aprovação do comitê de ética da UFRGS (CEUA/UFRGS)



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 35442

Título: AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA COENZIMA Q10 SOBRE A TOXICIDADE DO ÁCIDO QUINOLÍNICO EM ESTRIADO DE RATOS WISTAR

Vigência: 01/10/2018 à 31/07/2022

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ANGELA TEREZINHA DE SOUZA WYSE - coordenador desde 01/10/2018
FERNANDA SILVA FERREIRA - Aluno de Doutorado desde 01/10/2018

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 01/10/2018 - Sala 330 do Anexo I do Prédio da Reitoria - Campus Centro - Av. Paulo Gama, 100 - Porto Alegre- RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 396 ratos Wistar machos de 21 dias e 50 ratos Wistar machos de 30 dias provenientes do Biotério do Depto de Bioquímica; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 5 de Outubro de 2018

MARCELO MELLER ALIEVI
Coordenador da comissão de ética