



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**Ácido quinolínico altera o status oxidativo e
a função mitocondrial em fatias de estriado
de ratos Wistar: papel neuroprotetor do
ácido quinurênico**

Fernanda Silva Ferreira

Orientadora: Prof^a Dr^a Angela Terezinha de Souza Wyse

Porto Alegre

2017

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

Ácido quinolínico altera o status oxidativo e a função mitocondrial em fatias de estriado de ratos Wistar: papel neuroprotetor do ácido quinurênico

Fernanda Silva Ferreira

Orientadora: Prof^a Dr^a Angela Terezinha de Souza Wyse

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito à obtenção do título de Mestre em Bioquímica

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Ferreira, Fernanda Silva

Ácido Quinolinico altera o status oxidativo e a função mitocondrial em fatias de estriado de ratos Wistar: papel neuroprotetor do Ácido Quinurênico / Fernanda Silva Ferreira. -- 2018.

66 f.

Orientadora: Angela Wyse.

Dissertação (Mestrado) -- 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, 2018.

1. Ácido Quinolinico. 2. Ácido Quinurênico. 3. estresse oxidativo. 4. mitocôndria. 5. Na⁺,K⁺-ATPase. I. Wyse, Angela, orient. II. Título.

*À minha mãe, Rosângela, por ser o meu exemplo e pela confiança,
incentivo e amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Angela Wyse, pela oportunidade de participar do seu grupo, por acreditar em mim e confiar no meu trabalho. Obrigada pelos conselhos, ensinamentos, e por ser esse exemplo de profissionalismo, dedicação e otimismo!

À UFRGS, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica pelo ensino gratuito e de qualidade.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

À professora Vanusa, pela colaboração neste trabalho.

Aos queridos colegas e amigos do laboratório 36: Helena, Felipe, Paula, Dani, Cassi, Tiago, Eduardo, Carol Gessinger e Carol Prezzi. Muito obrigada por toda a ajuda e todos os ensinamentos, além das boas risadas compartilhadas. Trabalhar com vocês foi um prazer e tornou essa jornada muito mais leve. Em especial, agradeço ao Felipe por tudo que me ensinou e mesmo à distância, por todo o apoio, e à Helena, por estar presente do início ao fim da execução desse trabalho, por todo o apoio experimental e psicológico e pela amizade.

À Paula Pierozan, por me acompanhar desde a graduação, pelos ensinamentos, por toda a ajuda na execução dos experimentos e por todo o apoio, mesmo à distância.

Aos meus amigos, sempre dispostos a ajudar no que fosse preciso, obrigada pelo apoio, pelas palavras de conforto, por estarem sempre por perto me apoiando e torcendo por mim!

À minha família, em especial aos meus pais, Cezar e Rosângela, por todo o apoio, pelo amor incondicional, pelo incentivo e por ser o meu alicerce sempre! Amo vocês

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.

Paulo Beleki

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 METABOLISMO DO TRIPTOFANO - VIA DAS QUINURENINAS.....	1
1.2 ÁCIDO QUINURÊNICO	2
1.3 ÁCIDO QUINOLÍNICO.....	3
1.4 RELAÇÃO KYNA/QUIN EM DESORDENS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	5
1.5 ESTRESSE OXIDATIVO	5
1.6 Nrf2.....	7
1.7 CADEIA TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS	8
1.8 Na ⁺ ,K ⁺ ATPase	10
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 METODOLOGIA E RESULTADOS	13
3.1 Artigo científico	14
4 DISCUSSÃO.....	47
5 CONCLUSÕES.....	55
6 PERSPECTIVAS	57
7 REFERÊNCIAS	58
8 ANEXOS	66
8.1 Anexo I - Carta de aprovação do comitê de ética	66

RESUMO

A degradação do triptofano pela via das quinureninas produz diversos metabólitos neuroativos. Dentre eles, o ácido quinolínico (QUIN) é um agonista seletivo de receptores NMDA que exerce efeitos neurotóxicos sobre as células, causando aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, disfunção mitocondrial e ativação de vias de morte celular. A concentração de QUIN se encontra aumentada em situações de injúria cerebral, inflamação e processos neurodegenerativos. Já o ácido quinurênico (KYNA), produzido pela mesma via, é antagonista de receptores glutamatérgicos e colinérgicos e possui propriedades neuroprotetoras, atuando como antioxidante. Alterações na razão KYNA/QUIN estão correlacionadas a manifestação de desordens do sistema nervoso central, mas os mecanismos envolvidos necessitam ser melhor elucidados. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação de QUIN sobre parâmetros oxidativos (produção de espécies reativas de oxigênio, atividade de enzimas antioxidantes, peroxidação lipídica, danos a proteínas e ao DNA, níveis de nitritos e imunoconteúdo de iNOS), bem como sobre parâmetros de função mitocondrial e bioenergéticos (massa e potencial de membrana mitocondrial, cadeia transportadora de elétrons), sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase e os níveis de Nrf2 em fatias de estriado de ratos Wistar jovens e o possível papel neuroprotetor de KYNA frente a esses insultos. Fatias de estriado de ratos Wistar de 30 dias de idade foram pré-incubadas com KYNA 100 μM por 15 minutos, posteriormente QUIN 100 μM foi acrescentado ao meio de incubação por mais 30 minutos. Nossos resultados mostraram que o QUIN causou um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e uma diminuição na atividade das enzimas antioxidantes, causando também danos a proteínas, lipídios e DNA, assim como diminuiu os níveis de Nrf2. KYNA foi capaz de prevenir os efeitos causados por QUIN, exceto o dano a proteínas. Além disso, QUIN foi capaz de alterar a massa e o potencial de membrana mitocondrial, assim como a atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons, sendo esses efeitos prevenidos por KYNA. A diminuição na atividade da Na^+, K^+ -ATPase não foi prevenida por KYNA. Nossos resultados mostram que o QUIN causa alterações no status oxidativo e na função mitocondrial em fatias de estriado de ratos, sendo a maioria dessas alterações prevenida por KYNA, possivelmente por sua ação antioxidante. Este estudo permite elucidar alguns dos mecanismos de KYNA frente aos danos causados por QUIN.

Palavras chaves: ácido quinolínico, ácido quinurênico, Nrf2, estresse oxidativo, mitocôndria, Na^+, K^+ -ATPase.

ABSTRACT

The degradation of tryptophan by kynurenine pathway produce important metabolites with neurological activity. Among them, the quinolinic acid (QUIN) is a selective antagonist of NMDA receptors that can exert neurotoxic effects on the cells, causing an increase in the production of reactive oxygen and nitrogen species, mitochondrial dysfunction and activation of cell death pathways. The QUIN concentration is increased in situations of brain injury, stress, inflammation and neurodegenerative processes. However, kynurenic acid (KYNA), produced by the same pathway, is an antagonist of glutamatergic and cholinergic receptors, besides that KYNA has neuroprotective properties given its antioxidant action. Changes in the KYNA/QUIN ratio are correlated with the manifestation of central nervous system disorders, but the mechanisms involved need to be better elucidated. The aim of this project was to evaluate the action of QUIN on oxidative parameters such as the production of reactive species of oxygen, the activity of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, protein and DNA damage, nitrite levels and iNOS immunocontent; on mitochondrial function, as mass and mitochondrial membrane potential, electron transport chain, also Na^+, K^+ -ATPase activity and levels of Nrf2 in striatum slices of young Wistar rats and the possible neuroprotective role of KYNA against these insults. Striatum slices from 30-old-day Wistar rats were pre-incubated with KYNA 100 μM by 15 minutes, subsequently 100 μM QUIN was added to the incubation medium for more 30 minutes. Our results demonstrate that QUIN causes oxidative and mitochondrial changes in striatum slices of rats, most of these changes being prevented by KYNA, possibly due to its antioxidant action. This study allows elucidating some of the mechanisms of KYNA against the damages caused by QUIN.

Keywords: quinolinic acid, kynurenic acid, Nrf2, oxidative stress, mitochondria, Na^+, K^+ -ATPase.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	3-hidroxi-5-metil-isoxasolpropionato
ARE	elementos de resposta antioxidante
ATP	adenosina trifosfato
CAT	catalase
cNOS	óxido nítrico sintase constitutiva
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
GPx	glutaciona peroxidase
IDO	indoleamina-2,3-dioxigenase
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
KAT	quinureninas aminotransferases
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated Protein 1</i>
KMO	quinurenina 3-monooxigenase
KYNA	ácido quinurênico
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NMDA	N-metil-D-aspartato
Nrf2	<i>factor erythroid 2-related factor 2</i>
QUIN	ácido quinolínico
SDH	succinato desidrogenase
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TDO	triptofano-2,3-dioxigenase
Trp	triptofano

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via das quinureninas	2
Figura 2. Estrutura da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	11

1 INTRODUÇÃO

1.1 METABOLISMO DO TRIPTOFANO - VIA DAS QUINURENINAS

O triptofano (Trp) é um aminoácido essencial utilizado na síntese de proteínas e precursor de moléculas com importante papel fisiológico. No cérebro, a degradação do Trp pode acontecer por duas vias: a via do metoxi-indol e a via das quinureninas. A via do metoxi-indol consome entre 1-5% de Trp e leva a produção de serotonina, e na glândula pineal, melatonina. Já a via das quinureninas é responsável por 95-99% do catabolismo de Trp e a partir dela são produzidas diversas moléculas neuroativas com atividades biológicas, como o cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺), ácido quinurênico, ácido quinolínico, entre outros (Jeon & Kim, 2017; Stone, 1993)

A via das quinureninas (Figura 1) é a principal rota de metabolização do Trp, acontecendo principalmente no fígado, que contém todas as enzimas necessárias para a síntese de NAD⁺ e consome cerca de 60% do Trp disponível. 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 (Jeon & Kim, 2017). A quinurenina pode ser catabolizada por duas vias, levando à produção de ácido quinurênico pelas quinureninas aminotransferases (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).

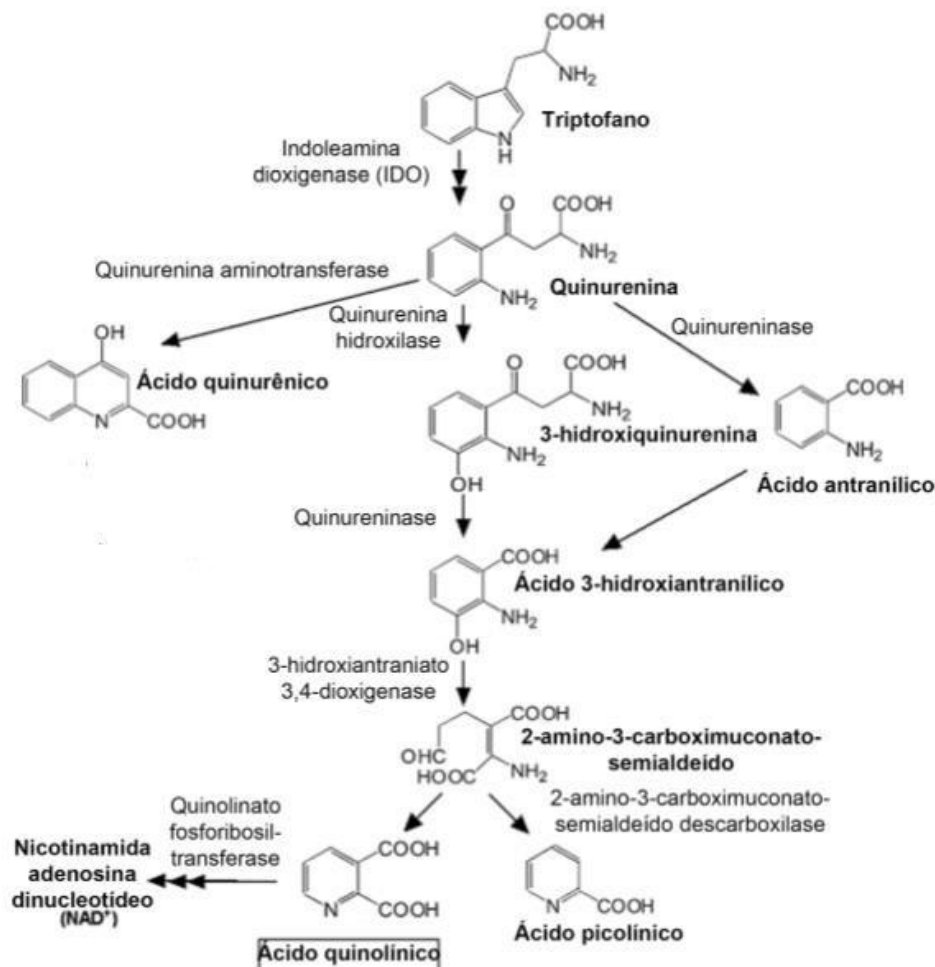


Figura 1: via das quinureninas (adaptado de Guillemin *et al*, 2012)

1.2 ÁCIDO QUINURÊNICO

Nos astrócitos, devido à ausência da enzima KMO, a via das quinureninas é ativada para a formação de ácido quinurênico (KYNA). KYNA é um importante antagonista dos receptores glutamatérgicos 3-hidroxi-5-metil-isoxasolpropionato (AMPA), cainato e N-metil-D-aspartato (NMDA), além de ser antagonista não competitivo dos receptores colinérgicos do subtipo $\alpha 7$ nicotínicos (Hilmas *et al.*, 2001). Suas concentrações fisiológicas cerebrais variam desde a ordem nanomolar até baixos níveis na ordem micromolar, sendo encontrado na faixa de

15 a 150 nM no líquido cefalorraquidiano (Hilmas et al., 2001; Moroni et al., 1988; Turski et al., 1988).

Diversos estudos têm atribuído propriedades neuroprotetoras ao KYNA, principalmente pela ação antagonista de receptores NMDA e $\alpha 7$ -nicotínicos, além de seu papel antioxidante, agindo como um agente sequestrador de radicais livres (Fujigaki et al., 2017). No entanto essas propriedades são dependentes de altas concentrações de KYNA em relação aos níveis fisiológicos (Moroni et al., 2012). Além disso, os diferentes mecanismos de neuroproteção são dependentes de concentrações distintas de KYNA no cérebro (Moroni et al., 2012).

Alterações na concentração cerebral de KYNA estão relacionadas a diversas desordens neurodegenerativas. Seus níveis estão diminuídos na fase terminal da Doença de Parkinson (Ogawa et al., 1992) e também na Doença de Huntington (Beal et al., 1990). Estudos realizados em modelos utilizando animais reforçam que esse metabólito pode exercer efeito neuroprotetor, e anticonvulsivante, diminuindo a vulnerabilidade neuronal (Cozzi et al., 1999; Pellicciari et al., 1994; Poeggeler et al., 1998).

1.3 ÁCIDO QUINOLÍNICO

O ácido quinolínico (QUIN), também produzido pela via das quinureninas, é sintetizado por macrófagos ativados e pela microglia, agindo como um agonista seletivo de receptores NMDA. Fisiologicamente, ele está presente em baixas concentrações no sistema nervoso central (SNC), porém, em casos de injúria cerebral, estresse e inflamação (Jeon & Kim, 2017), citocinas pró-inflamatórias estimulam a ativação da via das quinureninas, levando a um aumento considerável da concentração de QUIN (Cruz et al., 2013).

A toxicidade causada por QUIN é mediada por diversos mecanismos. A ativação de receptores NMDA acarreta um aumento no influxo de Ca^{2+} citoplasmático. Com isso, há um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN, respectivamente), disfunção mitocondrial, diminuição dos níveis de adenosina trifosfato (ATP), ativação de vias de morte celular, entre outros (Cruz et al., 2013; Jeon & Kim, 2017).

Os efeitos neurotóxicos de QUIN também podem acontecer por mecanismos independentes da ativação dos receptores NMDA. A produção de ERO/ERN é bastante prejudicial no SNC, pois o sistema antioxidante do cérebro é limitado. O aumento nas concentrações de QUIN leva a um aumento de ERO/ERN, acarretando uma maior liberação de glutamato pelos neurônios, com inibição da recaptção do mesmo pelos astrócitos (Tavares et al., 2008), causando excitotoxicidade. Outro mecanismo importante de neurotoxicidade é a peroxidação lipídica (Cruz et al., 2013).

O aumento da concentração de QUIN no SNC está correlacionado à doenças neurodegenerativas, como a esclerose lateral amiotrófica e as Doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington (Guidetti et al., 2004; Tan et al., 2012), além de depressão (Jeon and Kim, 2017), da demência associada à AIDS (Guillemin et al., 2005), e outras desordens associadas aos processos inflamatórios e degenerativos.

1.4 RELAÇÃO KYNA/QUIN EM DESORDENS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A diminuição na concentração de KYNA e um aumento na concentração de QUIN estão diretamente correlacionados ao desenvolvimento e à progressão de diversas desordens, já que o equilíbrio entre esses metabólitos no SNC pode influenciar na sobrevivência celular (Pierozan et al., 2017). A razão KYNA/QUIN se encontra diminuída em pacientes com depressão (Savitz et al., 2015), Doenças de Alzheimer e Huntington (Zádori et al., 2009), transtorno bipolar (Parrott and O'Connor, 2015), e em modelo *in vitro* de esclerose lateral amiotrófica (Chen et al., 2011).

Além disso, estudos *in vitro* demonstram a proteção exercida pelo KYNA em células expostas ao QUIN (Pierozan et al., 2017), entretanto, esses mecanismos protetores necessitam ser melhor elucidados.

1.5 ESTRESSE OXIDATIVO

O radical livre é definido como uma espécie química que possui um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo, o que acarreta elevada instabilidade e reatividade na molécula. A produção de radicais livres é um processo fisiológico que possui importantes funções biológicas. Esse processo acontece principalmente nas mitocôndrias, por meio da cadeia transportadora de elétrons, e a produção em proporções adequadas possibilita a geração de ATP, a ativação de genes, contribui com a transferência de elétrons em reações bioquímicas e participa de mecanismos de defesa em processos infecciosos. As principais espécies reativas são ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio

(H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\bullet). O peroxinitrito (ONOO^-) é formado a partir da reação do NO^\bullet com o O_2^- (Halliwell, 2012).

Em condições fisiológicas, as espécies reativas são mantidas em equilíbrio pela ação do sistema de defesa antioxidante do organismo. Essas defesas podem ser enzimáticas ou não enzimáticas, e são capazes de inibir ou reduzir possíveis danos causados pela ação deletéria das espécies reativas. O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx) (Halliwell, 2011). A SOD é a enzima responsável por catalisar a reação de dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$, 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, estando em maior quantidade no fígado. Já a GPx, responsável por reduzir o H_2O_2 a H_2O , localiza-se nas membranas celulares (Halliwell, 2011; 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, entre outros (Rahal et al., 2014).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, seja pela produção excessiva de espécies reativas ou por uma redução das defesas antioxidantes, e pode estar associado a diversas patologias. O cérebro é particularmente suscetível a danos oxidativos, devido ao alto consumo de oxigênio, a presença de lipídios de membrana ricos em ácidos graxos insaturados e por possuir baixos níveis de defesas antioxidantes. Elevadas concentrações de espécies reativas causam danos às biomoléculas, como proteínas, lipídios e DNA, podendo levar a perda de função celular. (Halliwell, 1994; Rahal et al., 2014). Estudos têm sugerido o envolvimento do

estresse oxidativo na patogênese de doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e Huntington (Rahal et al., 2014; Sochocka et al., 2013).

Estudos anteriores demonstraram que um dos principais mecanismos relacionados aos danos gerados pelo QUIN é o estresse oxidativo. O aumento nas suas concentrações acarreta um aumento nas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e causa diminuição da atividade de enzimas antioxidantes e dos níveis de glutathiona (Cruz et al., 2013).

1.6 Nrf2

Para evitar os danos causados pelas espécies reativas, o organismo possui mecanismos de regulação da homeostase redox. Dentre eles, um dos principais é o Nrf2 (do inglês *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) (Niture et al., 2014), o qual é um fator de transcrição considerado regulador chave da resposta antioxidante do organismo. Sua ativação induz a expressão de genes que codificam proteínas e enzimas antioxidantes, desempenhando um papel essencial na proteção e na sobrevivência das células. Dentre os seus genes alvo, podem ser citados: heme oxigenase 1 (HO-1), SOD, CAT, GPx, glutathiona redutase (GR), NADPH quinona oxidoreductase 1 (NQO1) (Niture et al., 2014).

Fisiologicamente, o Nrf2 se encontra no citosol, ancorado a duas proteínas Keap1 (do inglês *Kelch-like ECH-associated Protein 1*). Essas proteínas têm ação inibitória, mantendo as concentrações de Nrf2 baixas em situações de homeostasia celular. No entanto, na presença de estímulos pró-oxidantes, tais como o aumento de ERO e ERN, resíduos de cisteína dessas proteínas são oxidados, resultando numa alteração na conformação de Keap1 e consequente liberação de Nrf2. As moléculas livres de Nrf2 translocam-se para o núcleo da

célula e se ligam ao elemento da resposta antioxidante (ARE), localizado na região promotora dos genes alvo, iniciando-se assim, o processo de transcrição (Itoh et al., 1999; Kaspar et al., 2009).

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 (Baird and Dinkova-Kostova, 2011a; Holmström et al., 2017).

Por ser um importante mediador da resposta antioxidante, a expressão de Nrf2 pode ser alterada em situações de dano cerebral. Um aumento na concentração de metabólitos tóxicos, como QUIN, QUIN acarreta uma menor expressão do Nrf2, podendo influenciar na expressão das enzimas antioxidantes e de outros mecanismos de defesa celular (Tasset et al., 2010).

1.7 CADEIA TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS

Devido à sua elevada atividade metabólica, o cérebro, que possui uma reserva energética pequena, necessita de um contínuo suprimento energético. Através da glicólise, do ciclo do ácido cítrico e da fosforilação oxidativa é produzida a energia responsável pela manutenção da atividade cerebral (Hussain Bhat et al., 2015).

A mitocôndria é uma organela celular que desempenha importante papel na manutenção da homeostasia celular, a sua principal função é no metabolismo energético, com a produção de ATP. A energia na forma de ATP é essencial

para a realização de diversas funções celulares. Uma redução nos seus níveis pode resultar em ameaças à homeostase dos tecidos, podendo levar a danos oxidativos, excitotóxicos e levar ao início de processos pró apoptóticos. Além disso, a mitocôndria está envolvida com a sinalização intracelular, mecanismos de apoptose, metabolismo de aminoácidos, entre outros. (Sun et al., 2016).

A produção de ATP acontece na membrana mitocondrial interna através da cadeia transportadora de elétrons. A cadeia transportadora de elétrons é composta por quatro complexos enzimáticos e dois transportadores móveis de elétrons (coenzima Q e citocromo c), e é nela que ocorre a oxidação dos equivalentes redutores NADH e FADH₂, proveniente da glicólise e do ciclo do ácido cítrico (Vuoristo et al., 2016).

Os elétrons proveniente dos NADH são transferidos ao complexo I (NADH desidrogenase ou NADH:ubiquinona oxirredutase), que transfere os elétrons para a ubiquinona, resultando na formação de ubiquinol. O complexo II (succinato:ubiquinona oxiderrutase) é formado pela enzima succinato desidrogenase (SDH) e mais três subunidades. Neste complexo, há a redução da ubiquinona a ubiquinol com elétrons provenientes do FADH₂. O complexo III (ubiquinona-citocromo c oxirredutase) transfere os elétrons do ubiquinol para o citocromo c, e o complexo IV (citocromo c oxidase), por sua vez, catalisa a transferência dos elétrons do citocromo c para o O₂, reduzindo-o a H₂O. Esse fluxo de elétrons é acompanhado pelo bombeamento de prótons realizado pelos complexos I, III e IV da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. Com isso, há a criação de um gradiente eletroquímico utilizado como força próton-motriz pelo complexo V (ATP sintase) para a síntese de ATP partir de ADP e

fosfato inorgânico (Pi) e este processo é denominado fosforilação oxidativa (Navarro & Boveris, 2007).

Alterações no funcionamento normal da mitocôndria e dos complexos que formam a cadeia transportadora de elétrons podem levar à diminuição da síntese de ATP e a um aumento na produção de espécies reativas, e essas disfunções podem estar relacionadas a distúrbios neurológicos, como demência e doenças neurodegenerativas (Lin & Beal, 2006; Wilkins & Morris, 2017). Estudos anteriores mostram que 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 (Lugo-Huitrón et al., 2013).

1.8 Na⁺,K⁺-ATPase

A Na⁺,K⁺-ATPase é uma proteína integral de membrana que utiliza a 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 através da membrana. O gradiente formado é importante para uma série de funções celulares, como a manutenção do potencial de membrana, regulação de volume celular, excitabilidade neuronal, transporte de moléculas e neurotransmissores. (Kaplan, 2002; Ogawa et al., 2009).

Estruturalmente (Figura 2), 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, contendo os sítios de ligação para os íons Na⁺ e K⁺, ATP e também para a ouabaína (glicosídeo cardíaco e inibidor específico da

enzima). Já a subunidade β é uma proteína de adesão celular necessária para direcionar a subunidade α para a membrana plasmática. A subunidade γ é responsável pela modulação da atividade da enzima. A subunidade catalítica pode apresentar quatro isoformas, distribuídas nas células e no SNC: $\alpha 1$ (ubiquamente expressa), $\alpha 2$ (em subconjuntos de neurônios e astrócitos), $\alpha 3$ (expressa exclusivamente em neurônios) e $\alpha 4$ (não expressa no SNC). Já a subunidade possui duas isoformas, $\beta 1$ (expressa em neurônios) e $\beta 2$ (expressa em astrócitos) (Lopina, 2000).

A atividade enzimática da Na^+, K^+ -ATPase é regulada por diversos fatores, como disponibilidade de substrato, fosforilação, alterações de membrana, entre outros (Wang, 2003). Essa enzima é sensível ao ataque de radicais livres (Vitvitsky et al., 2012). A inibição de sua atividade tem sido relacionada a diversas patologias do SNC, como doenças neurodegenerativas, depressão (Aperia, 2007; Goldstein et al., 2006), e erros inatos do metabolismo (Bavaresco et al., 2007; Ferreira et al., 2011; Kolling et al., 2016; Wyse et al., 2002). A ação de QUIN sobre essa enzima está relacionada ao aumento nas espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e alterações mitocondriais, acarretando diminuição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase (Antunes Wilhelm et al., 2013).

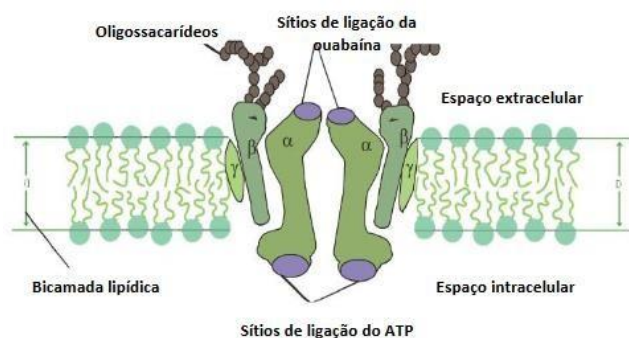


Figura 2: Estrutura da Na^+, K^+ -ATPase (Suhail, 2010, modificado)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Considerando que o QUIN é um composto tóxico encontrado em altas concentrações em diversas desordens neurodegenerativas, e que o KYNA possui propriedades neuroprotetoras e antioxidantes, o objetivo do presente trabalho é investigar o efeito neuroprotetor de KYNA sobre alterações em parâmetros oxidativos e mitocondriais em fatias de estriado de ratos Wistar jovens tratados com QUIN.

2.2 Objetivos específicos

1. Investigar o efeito de QUIN e/ou KYNA sobre a produção de ERO;
2. Investigar o efeito de QUIN e/ou KYNA sobre a atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx;
3. Avaliar o efeito de QUIN e/ou KYNA sobre o conteúdo de sulfidrilas, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e dano ao DNA;
4. Investigar o efeito de QUIN e/ou KYNA sobre os níveis de nitritos e o imunoc conteúdo da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS);
5. Avaliar o efeito de QUIN e/ou KYNA sobre a massa mitocondrial, o potencial de membrana mitocondrial e a cadeia transportadora de elétrons;
6. Avaliar o efeito de QUIN e/ou KYNA na atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase;
7. Investigar o efeito de QUIN e/ou KYNA sobre os níveis de Nrf2 citoplasmático e nuclear.

3 METODOLOGIA E RESULTADOS

Os materiais e métodos e os resultados serão apresentados na forma de artigo científico intitulado:

Kynurenic acid restores Nrf2 levels and prevent quinolinic acid-induced toxicity in rat striatal slices

Fernanda Silva Ferreira, Helena Biasibetti-Brendler, Paula Pierozan, Felipe Schmitz, Carolina Gessinger Bertó, Caroline Acauan Prezzi, Vanusa Manfredini, Angela T.S. Wyse

Periódico: Molecular Neurobiology

Status: Aceito para publicação

3.1 Artigo científico

Kynurenic acid restores Nrf2 levels and prevent quinolinic acid-induced toxicity in rat striatal slices

Fernanda Silva Ferreira^{1,2}, Helena Biasibetti-Brendler², Paula Pierozan², Felipe Schmitz^{1,2}, Carolina Gessinger Bertó², Caroline Acauan Prezzi², Vanusa Manfredini⁴, Angela T.S. Wyse^{1,2,3}

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.

2. Laboratório de Neuroproteção e Doenças Neurometabólicas, Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.

3. Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.

4 Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, BR 472, Km 585, 118, Uruguaiana, RS, CEP 97500-970, Brazil

Address reprint requests to: Dra. 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

ABSTRACT

Kynurenic acid (KYNA) and quinolinic acid (QUIN) are metabolites produced in the degradation of tryptophan and have important neurological activities. KYNA/QUIN ratio changes are associated with central nervous system disorders, whose mechanisms are not well elucidated. In the present study we investigate the ability of KYNA in prevent the first events preceding QUIN-induced neurodegeneration in striatal slices of rat. We evaluate the protective effect of KYNA on oxidative status (reactive oxygen species production, antioxidant enzymes activities, lipid peroxidation, nitrite levels, protein and DNA damage and iNOS immunocontent), mitochondrial function (mitochondrial mass, membrane potential, respiratory chain enzymes) and Na⁺,K⁺-ATPase in striatal slices of rats treated with QUIN. Since QUIN alters the levels of Nrf2, we evaluated the influence of KYNA-protection on this parameter. Striatal Slices from 30-day-old Wistar rats were preincubated with KYNA (100 μM) for 15 minutes, followed by incubation with 100 μM QUIN for 30 minutes. Results showed that KYNA prevented QUIN-effects on ROS production, restored antioxidant enzymes activities and the protein and lipid damage, as well as the Nrf2 levels. KYNA also prevented the QUIN-effects on mitochondrial mass and mitochondrial membrane potential, as well as on the decrease in the activities of complex II, SDH and Na⁺,K⁺-ATPase. We suggest that KYNA exerts antioxidant effects against QUIN preventing changes in Nrf2 levels, oxidative imbalance and mitochondrial dysfunction. This study elucidates some of the protective effects of KYNA against the damage caused by QUIN treatment.

Keywords: kynurenic acid, quinolinic acid, Nrf2, oxidative status, mitochondrial function

INTRODUCTION

The kynurenine pathway (KP) is the main route of degradation of dietary tryptophan. This route is responsible for the production of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺), quinolinic acid (QUIN), kynurenic acid (KYNA) and other substances with important biological activity [1]. An imbalance in the concentration of these substances is related to several disorders, such as neurodegenerative diseases, depression, schizophrenia and infections in the central nervous system (CNS) [2]. KYNA is mostly synthesized by astrocytes [3] and has several functions and biological targets depend on its concentration, such as antagonist of the NMDA receptors, antagonist of the cholinergic receptors, subtype $\alpha 7$ nicotinic, agonist of G protein-coupled receptor 35 (GPR35) and free-radical scavenger [3–5]. QUIN is synthesized by infiltrating macrophages and activated microglia and acts as agonist of glutamatergic receptors [6, 7]. In physiological conditions, QUIN is present in low concentration in the CNS, but its levels are increased in brain injury [6], causing an increase in the reactive species of oxygen (ROS) production [8], pro-inflammatory cytokines [7], lipid peroxidation [9] and decreasing energy metabolism [10] and neurotransmitters uptake, which can lead to excitotoxicity [11]. The concentration of both metabolites (KYNA and QUIN) is directly correlated to the development and progression of several diseases [12]. In this context, KYNA/QUIN ratio is decreased in the brain of patients with depression [13], Alzheimer's disease, Huntington's disease [14] and bipolar disorder [15]. In addition, an *in vitro* study showed that cell damage caused by QUIN can be protected by KYNA [16], but the mechanisms of this protection are not fully clarified.

It has been shown that one of the main mechanisms related to the damage generated by QUIN is oxidative stress, which is defined by an imbalance between

the production and detoxification of reactive species [8, 17]. The increase in QUIN concentrations leads to an increase in the reactive species of oxygen and nitrogen and a decrease in the expression of Nrf2 [18], which can cause a decrease in the activation of enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses [8, 18].

Nrf2 has also been strongly correlated with the mitochondrial function [19], which is the main responsible for the production of free radicals. In this context, studies have shown that QUIN exerts effects on cellular energy metabolism, producing progressive mitochondrial dysfunction. The administration of QUIN leads to a change in the activity of complexes II, II-III and IV of the respiratory chain, inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase, pyruvate kinase and a decrease in ATP levels in the rat brain, suggesting that these effects may be related to oxidative stress [2].

Na⁺,K⁺-ATPase is an integral membrane protein responsible for the maintenance of the cellular ionic gradient, carrying Na⁺ into the cell and K⁺ outside the cell, playing an important role in neuronal excitability and transport of molecules and neurotransmitters [20]. Its activity is susceptible to an increase in ROS, lipid peroxidation, oxidation of sulfhydryl groups and ATP depletion [21]. The inhibition of its activity may induces significant damage to brain functions, which may be found in various CNS diseases [20].

An important feature of KYNA is the fact that high levels of this compound (> 100 µM) have direct antioxidant properties due to its ability as free radical scavenger [22, 23] and can be considered a potent endogenous antioxidant. In addition, KYNA reduces the accumulation of nitric oxide induced by NMDA [24]. However, understanding the mechanisms of KYNA action is difficult since the metabolite seems to have has several biological targets.

Therefore, in the present study, we were interested to investigate the ability of KYNA to prevent the first events preceding QUIN-induced neurodegeneration in striatal slices of rat. We evaluated the mechanisms of this metabolite on the redox homeostasis, ROS production, antioxidants defenses, biomolecules damage, nitrite levels, Nrf2 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) immunoccontent. We also investigated the protective effects of KYNA on the energy metabolism alterations caused by QUIN (Complex II, succinate dehydrogenase, cytochrome c oxidase), mitochondrial mass and potential membrane ($\Delta\psi$), as well as on Na⁺,K⁺-ATPase activity. The hypothesis of this work is that KYNA could be a promising therapeutical tool to counteract the deleterious actions of QUIN on CNS.

MATERIAL AND METHODS

Animals and Reagents

Male Wistar rats (30-day- old) were obtained from Central Animal House of Biochemistry Department, Institute of Basic Health Sciences at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, in Porto Alegre, Brazil. Animals were maintained under a controlled 12/12 hours light/dark cycle and constant temperature (22 ± 1 °C) colony room, with free access to water and 20 % (w/w) commercial protein chow. The ethical standards followed the official governmental guidelines issued by the Brazilian Federal of Societies for Experimental Biology, following the Guide for Care and Use of Laboratory Animals and Arouca Law (Law nº 11.794/2008) and the experimental protocol was approved by the University's Ethics Committee (CEUA) under the project #31435.

QUIN, KYNA, MK-801, acrylamide, bisacrylamide, SDS and all other chemical reagents used for analysis were obtained from Sigma Aldrich, St. Louis, MO.

USA. Antibodies were purchased from Sigma Aldrich, Cell Signaling Technology and Abcam.

Preparation and incubation of striatal slices

Seventy-eight animals were killed by decapitation, the brains were removed, and the striatum was rapidly dissected in ice-cold Krebs-HEPES buffer of the following composition: 124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 25 mM Na-HEPES, and 12 mM D-glucose, pH 7.4. Slices (0.4 mm) were prepared using a McIlwain Tissue Chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd., England) and separated in buffer at 4°C. Immediately after sectioning, slices were transferred to buffer for 15 min to recover from slicing trauma, before starting the experiments. This incubations were performed at 37 °C.

A dose-response curve of KYNA (8, 30 and 100 µM) was initially performed to determine a better dose to prevent damage by QUIN to the redox homeostasis of cells using DCF-DA assay. After KYNA's concentration selection, slices were preincubated with KYNA (100 µM) for 15 minutes. After, slices were exposed for 30 minutes to QUIN (100 µM), co-incubated with KYNA. Slices corresponding to the control group were incubated in a normal Krebs-HEPES buffer. This study used 5-7 striatal slices per sample, and after time of incubation, these slices were weighed, homogenized and centrifuged to remove debris.

Tissue preparation

For determination of oxidative stress parameters and nitrite levels, the slices were homogenized (1:10, w/v) of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 140 mM KCl. The homogenates were centrifuged at 800xg for 10 min

at 4 °C to remove debris. The pellets were discarded, and the supernatants were immediately separated and used for the measurements of oxidative stress.

For complex II, SDH and cytochrome c activity determination, slices were homogenized (1:20 w/v) in SETH buffer (250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 10 mM Trizma base, 50 UI/ml heparin), pH 7.4. The homogenates were centrifuged at 800×g for 10 min to remove debris, and the supernatants were used for enzyme activity determination.

2'7'-Dichlorofluorescein Fluorescence Assay

Reactive oxygen species production was measured following the protocol of LeBel and colleagues [25], based on the oxidation of 2'7'-dichlorofluorescein (H₂DCF). Striatum supernatants (60 µL) were incubated for 30 min at 37 °C in the dark with 240 µL of 100 µM 2'7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) solution in a 96-well plate. H₂DCF-DA is cleaved by cellular esterases and the resultant H₂DCF is eventually oxidized by ROS present in samples. The reaction produces the fluorescent compound, dichlorofluorescein (DCF), which was measured at $\lambda_{em}=488$ nm and $\lambda_{ex}=525$ nm; results were represented as nmol DCF/mg protein..

Nitrite Assay

Nitrite is the stable endproduct of the autoxidation of NO• in aqueous solution [26]. Nitrite levels were measured using the Griess reaction; 50 µL of supernatants were mixed with 50 µL Griess reagent (1:1 mixture of 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid and 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in water) and incubated in 96-well plates for 10 min at room temperature. The absorbance was measured on a microplate reader at a

wavelength of 543 nm. Nitrite concentration was calculated using sodium nitrite standards [27].

Thiobarbituric Acid-Reactive Substances (TBARS)

Lipid peroxidation was measured through determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) according to the colorimetric assay previously described [28]. Briefly, samples and reagents were added in the following order: 100 μ L of supernatant; 25 μ L of SDS 8.1%; 190 μ L of 20% acetic acid in aqueous solution (v/v) pH 3.5; and 190 μ L of 0.8% thiobarbituric acid. The mixture was vortexed and the reaction was carried out in a boiling water bath for 1 h. A calibration curve was generated using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as a standard, and the results were represented as nmol of TBARS/milligram of protein.

Sulfhydryl Content

This assay was performed as described by Aksenov and Markesbery [29], which is based on the reduction of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by sulfhydryl groups, which in turn become oxidized (disulfide), generating a yellow derivative (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm. Briefly, 15 μ L of supernatant was added to 275 μ L of phosphate buffer saline pH 7.4 containing 1 mM EDTA. The reaction was started by the addition of 10 μ L of 10 mM DTNB and incubated for 30 min at room temperature in a dark room. The sulfhydryl content is inversely correlated to oxidative damage to the protein. Results were reported as nanomoles of TNB/ milligram of protein.

Superoxide Dismutase Assay (SOD)

Superoxide dismutase (SOD) activity was measured according to Marklund [30] and was based on pyrogallol autoxidation. This process is highly dependent on superoxide, the substrate of SOD, and is thereby inhibited by this enzyme. Thus, SOD activity can be measured indirectly following pyrogallol absorbance at 25 °C at 420 nm. The reaction medium contained supernatant (approximately 45 µg of protein), 50 mM Tris buffer, pH 8.2, with 1 mM EDTA, 80 U/mL CAT and 0.8 mM pyrogallol. A calibration curve was performed using purified SOD.

Catalase Assay (CAT)

The method is based on the disappearance of H_2O_2 in a reaction medium containing 20 mM H_2O_2 , 0.1% Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.0, and 0.1–0.3 mg protein/mL, measured in a spectrophotometer at 240 nm [31]. One CAT unit is defined as 1 mmol of H_2O_2 consumed per minute and the specific activity is represented as CAT units/mg protein.

Glutathione Peroxidase Assay (GPx)

Glutathione peroxidase (GPx) activity was evaluated according to Wendel [32] using tert-butyl hydroperoxide as substrate and monitoring NADPH oxidation at 25 °C at 340 nm. The reaction medium contained tissue supernatants (approximately 75 µg of protein), 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, with 1 mM EDTA, 0.4 mM sodium azide, 2 mM GSH, 0.1 U/mL glutathione reductase (GR), 0.1 mM NADPH and 0.5 mM tert-butyl hydroperoxide. One GPx unit (U) is defined as 1 µmol of NADPH consumed per min.

Single Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay)

Alkaline comet assay was performed as described by Singh [33] in accordance with general guidelines for use of the comet assay [34][35]. Slices

were homogenized (1:10, w/v) of phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged at 800×g for 10 min at 4 °C. 100 µL of supernatants were suspended in agarose and spread into glass microscope slides pre-coated with agarose, settled at 4 °C for 5 min. In order to maintain DNA as "nucleoids", slides were incubated in ice-cold lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10.0, and 1% Triton X-100 with 10% DMSO) to remove cell proteins. After lysis process, slides were placed on a horizontal electrophoresis chamber, covered with a fresh solution (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13) for 20 min at 4°C to allow DNA unwinding and the expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was performed for 20 min (25 V; 315 mA; 0.9 V/cm). Slides were then neutralized, washed in bi-distilled water, stained using a silver staining protocol (Maluf and Erdtmann 2000; Nadin, Vargas-Roig, and Ciocca 2001) and left to dry at room temperature overnight. Last, one hundred cells (50 cells from each of the two replicate slides) were arbitrarily chosen and analyzed using an optical microscope. Cells were visually scored from 0 (no migration) to 4 (maximal migration) based on tail length and intensity. Therefore, the damage index (DI) for cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). The slides were analyzed under blind conditions at least by two different individuals.

Na⁺,K⁺-ATPase Activity Assay

The slices were homogenized in 10 vol (1:10, w/v) of 0.32 mM sucrose solution containing 5.0 mM HEPES and 1.0 mM EDTA, pH 7.5. Homogenates were centrifuged at 1000×g for 10 min at 4 °C to remove debris. Supernatants were taken for Na⁺,K⁺-ATPase activity assay. The enzyme preparation (3–5 µg protein) was added to the reaction mixture containing 5.0 mM MgCl₂, 80.0 mM NaCl, 20.0 mM KCl, and 40.0 mM Tris–HCl, pH 7.4, in a final volume of 200 µL.

After 10 min of pre-incubation at 37 °C, the reaction was started by the addition of ATP to a final concentration of 3.0 mM and was incubated for 20 min. Controls were carried out under the same conditions with the addition of 1.0 mM ouabain. Na⁺,K⁺-ATPase activity was calculated by the difference between the two assays [36]. Inorganic phosphate (Pi) released was measured by the method of Chan *et al.* [37] and enzyme-specific activity was expressed as nanomoles Pi per minute per milligram of protein.

Mitochondrial Mass (MitoTracker Green) and Membrane Potential Analyses (MitoTracker Red)

Slices were mechanically dissociated in PBS containing collagenase. Dissociated cells were incubated with 100 nM MitoTracker Green and 100 nM MitoTracker Red (MTG and MTR, respectively, diluted from 1 mM stock solutions in DMSO), for 45 min, at 37 °C (in the dark), to determine the mitochondrial mass and membrane potential ($\Delta\psi$). A relationship was established between MTG and MTR staining for accessing the rate of mitochondrial function [38]. Immediately after staining, cell suspensions were analyzed on a FACS Calibur flow cytometer (Becton–Dickinson, San Jose, CA), using red (670 nm long pass) and green (530 nm/30) filters. Controls stained with individual dyes were used to determine compensation parameters. For each sample, 10,000 events corresponding to intact cells (as gated in FSC vs. SSC plots) were analyzed.

Complex II and Succinate Dehydrogenase Activities

The complex II activity was measured by the decrease in absorbance due to the reduction of 2,6-dichloroindophenol (DCIP) at 600 nm with 700 nm as reference wavelength ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), according to Fischer and colleagues [39]. Instants before this test, the supernatants were thawed and refrozen three

times to break the mitochondrial membrane. The reaction solution containing 40 mM potassium phosphate, pH 7.4, 16 mM succinate, and 8 μ M DCIP was pre-incubated with 40–80 μ g of protein homogenized at 30 °C for 20 min. After, 4 mM sodium azide and 7 μ M rotenone were added. The reaction initiated by the addition of 40 μ M DCIP and was verified by 5 min. The results were expressed as nmol/min/mg protein.

SDH activity was determined according to the method of Fischer and colleagues [39]. Through the decrease in absorbance of 2,6-dichloroindophenol (DCIP) at 600 nm with 700 nm as reference wavelength ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in the presence of phenazine methosulfate (PMS). For this test, the supernatants were thawed and refrozen three times to break the mitochondrial membrane. The reaction solution containing 40 mM potassium phosphate, pH 7.4, 16 mM succinate, and 8 μ M DCIP was pre-incubated with 40–80 μ g of protein homogenized at 30 °C for 20 min. After, 4 mM sodium azide, 7 μ M rotenone and 40 μ M DCIP were added. The reaction initiated by the addition of 1 mM PMS and was verified by 5 min. The results were expressed as nmol/min/mg protein.

Cytochrome c Oxidase Activity

The COX activity was determined according to Rustin and colleagues [40]. The enzymatic activity was measured at 25 °C for 10 min by the decrease in absorbance due to the oxidation of previously reduced cytochrome c at 550 nm with 580 nm as reference wavelength ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The reaction solution containing 10 mM potassium phosphate, pH 7.0, 0.6 mM n-dodecyl- β -D-maltoside, 2–4 μ g of protein homogenized and the reaction was initiated by

addition of 7.0 μg reduced cytochrome c. The results were expressed in nmol/min/mg protein.

Cellular Fractionation for Cytosolic and Nuclear Nrf2 Subunit

Cellular fractionation for cytosolic and nuclear Nrf2 subunit were obtained as described by Biasibetti and colleagues [41]. Slices were homogenized in 300 μL hypotonic lysis buffer containing 10 mM HEPES (pH 7.9), 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM dithiothreitol (DTT), 5 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate plus protease inhibitor cocktail. Samples homogenate were then lysed with 18 μL 10 % IGEPAL. The homogenates were centrifuged (14,000 $\times g$, 30 s, 4 $^\circ\text{C}$), and supernatants containing the cytosolic fraction were stored at -80 $^\circ\text{C}$. The nuclear pellet was resuspended in 200 μL ice-cold hypertonic extraction buffer (10 mM HEPES (pH 7.9), 0.40 M NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT, 5 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 0.25 mM EDTA, 25 % glycerol plus protease inhibitor cocktail). After 40 min of intermittent mixing, extracts were centrifuged (14,000 $\times g$, 10 min, 4 $^\circ\text{C}$), and supernatants containing nuclear protein were secured. For electrophoresis analysis, aliquot samples were dissolved in 25 % (v/v) of a solution containing 40 % glycerol, 5 % mercaptoethanol, and 50 mM Tris-HCl, pH 6.8.

Western Blot Analysis of Nrf2 cytosolic and Nuclear fractions, iNOS, CAT e SOD

Western blotting was performed as described by Biasibetti-Brendler and colleagues [42]. For electrophoresis analysis, striatal slices were homogenized in 200 μL of a lysis solution (2 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, and 4 % sodium dodecyl sulfate (SDS)). Then, samples were dissolved 1:1 in Laemmli buffer 2 x

containing 40 % glycerol, 5 % 2-mercaptoethanol, 50 mM Tris–HCl, pH 6.8 and 10 % SDS, and boiled for 5 min. Total protein homogenates were separated by 10 % SDS–PAGE (30 µg/lane of total protein) and transferred (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad) to nitrocellulose membranes for 1 h at 15 V in transfer buffer (48 mM Trizma, 39 mM glycine, 20 % methanol, and 0.25 % SDS). Blot was then incubated overnight at 4 °C in a blocking solution containing 5 % bovine serum albumin (BSA) and the following diluted antibodies: anti-Nrf2 (1:1000, Abcam), anti-CAT (1:1000, Abcam), anti-SOD2 (1:2000, Abcam), anti-iNOS (1:1000, Sigma Aldrich) and anti-β-actin (1:1000, Cell Signaling Technology). Blot was washed twice for 5 min with T-TBS and twice for 5 min with TBS and incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology) diluted 1:2000 or anti-mouse IgG (Cell Signaling Technology) diluted 1:1000. The blot was developed using a chemiluminescence kit (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore) and detected by ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences).

Protein determination

The protein content of samples was determined using bovine serum albumin as standard, according to Bradford [43] for Na⁺,K⁺-ATPase and Lowry [44] for the other parameters.

Statistical analysis

The data were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc Tukey's test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. All analyses and plots were performed using GraphPad Prism 6.0 software program in a compatible computer.

RESULTS

The neuroprotective capacity of KYNA against the toxic effects caused by QUIN on oxidative stress parameters and mitochondrial dysfunction in striatal slices of rats was evaluated. As KYNA exerts neuroprotection in different doses, a dose-response curve was initially performed to evaluate the protective effect against the production of reactive species by QUIN. For this, we used the oxidation of H₂DCF, as can be observed in Fig 1. The concentration of 100 μM was able to prevent the increase in ROS production caused by QUIN [F(3,40)= 5.301; p > 0.01] without affect the ROS production *per se*.

We first analyze the activities of the antioxidant enzymes as shown in Fig 2 (a-c). The results showed that KYNA was able to prevent the decrease on the activity of CAT, SOD and GPx caused by QUIN [F(1,24)= 7.089, p < 0.05; F(1,24)= 9.031, p < 0.01; F(1,20)= 6.816, p < 0.05, respectively]. KYNA *per se* did not show alterations on these parameters. Next, we evaluated the protective effects of KYNA on biomolecules damage caused by QUIN. As seen in Fig 3, KYNA was no able to counteract the QUIN-effects on sulfhydryl content (a) [F(1,24)= 7.971, p < 0.05] but prevented the increase on TBARS (b) [F(1,20)= 7.552, p < 0.05]. Regarding to DNA, KYNA *per se* increased DNA damage index when compared to control (c). However, KYNA associated with QUIN reduced DNA damage index when compared to QUIN group [F(1,20)= 7.189), p < 0.05]. Also, Fig 4 shows that QUIN increased nitrite levels (a) [F(1,20)= 9.274), p < 0.01] and did not alter iNOS immunocontent (b) [F(1,20)=0.07396, p > 0.05]; KYNA *per se* did not alter theses parameters, but prevented the increase in nitrite levels caused by QUIN.

Changes in redox homeostasis exert important action on mitochondrial functions. In line with this, we tested the protective effects of KYNA against QUIN on mitochondrial mass, membrane potential and respiratory chain parameters. Fig

5 shows that the treatment with KYNA was able to prevent the increase in the mitochondrial mass (a) and membrane potential (b) [$F(1,20)=12.46$, $p < 0.01$; $F(1,20)=12.99$, $p < 0.01$, respectively] caused by QUIN. Besides, KYNA prevented the decrease in the complex II (c) and SDH (d) activities [$F(1,20)=6.897$, $p < 0.05$; $F(1,20)=12.37$, $p < 0.01$] elicited by QUIN. However, QUIN was not able to alter cytochrome c oxidase activity (e) [$F(1,20)= 0.01867$, $p > 0.05$].

Since Na^+, K^+ -ATPase activity can be affected by oxidative stress, we searched for a role of its activity on the protective effects triggered by KYNA. As can be observed in Fig 6, QUIN decreased Na^+, K^+ -ATPase activity [$F(1,20)=45.22$, $p < 0.001$] and KYNA was not able to prevent this effect.

Considering that Nrf2 is a transcription factor with an important action of antioxidant defenses [45] and mitochondrial integrity maintenance [19], we analyzed the protective effects of KYNA on diminished Nrf2 levels caused by QUIN. As seen in Fig 7, the decrease in the immuncontent of cytoplasmatic (a) and nuclear (b) Nrf2 [$F(1,20)=45.22$, $p < 0.001$; $F(1,20)= 20.80$, $p < 0.01$] caused by QUIN were totally prevented by KYNA.

Finally, we addressed whether the NMDA signaling could play a role in the protection triggered by KYNA on striatal slices treated with QUIN. DCF-DA analyses showed that KYNA totally prevented QUIN-induced oxidative stress [$F(3,48)= 33,14$, $p > 0.01$]. Otherwise, blockade of NMDA receptors by MK-801 was not able to prevent these QUIN effects (Figure 8). This finding suggests that KYNA can prevent QUIN-induced ROS production by mechanisms that not involve NMDA blockade, but further experiments will be necessary to clarify this point.

DISCUSSION

Considering that a decrease in KYNA/QUIN ratio is closely related to the occurrence of cellular damage [12–15] and that preclinical studies have shown that KYNA exerts protective effect on QUIN neurotoxicity [16], the present study addressed the ability of KYNA in preventing QUIN-induced damage in striatal slices of rats. The results found in the work showed that KYNA is a potent antioxidant against QUIN-effects. Moreover, KYNA was able to prevent the mitochondrial alterations caused by QUIN. The KYNA effects as scavenger or antioxidant were documented by Lugo-Huitron *et al* [22] and Hardeland *et al* [23]. Also, another study *in vitro* using electron transfer showed that KYNA is 12 times more efficient than Trolox for scavenging hydroxyl radicals [46]. In line with this, together with the prevention of ROS production triggered by QUIN, we found that KYNA was able to prevent the decrease in CAT, SOD and GPx activities caused by the metabolite. In addition, it was able to prevent the lipid peroxidation observed in the striatal slices treated with QUIN, proving that the metabolite is efficient against QUIN-elicited oxidative stress. Interestingly, KYNA was not able to prevent the decrease on sulfhydryl content caused by QUIN.

Regarding to the effects of QUIN on DNA, our results are in agreement with previous studies that showed that QUIN, even in small doses, causes DNA fragmentation [47, 48] and that these alteration may be due to its excitotoxic effects [48], including the formation of reactive species [49]. Slices treated with KYNA and QUIN had the damage index partially reduced when compared to QUIN treatment. Surprisingly, we observed that KYNA alone was able to cause DNA damage. Although we do not know the mechanisms by which the compound exert its effects on DNA, we can suppose that, in an environment without high

ROS production, the metabolite could cause DNA damage by a reductive mechanism, since a study performed by Lu *et al* showed that an antioxidant compound found in green tea was able to cause DNA damage in human lung and skin cells through reductive mechanisms [50].

Our result showing that QUIN increases nitrite levels is in agreement with Braidy and colleagues [49] who showed that human neurons treated with QUIN increases NO levels. These authors suggest that this effect can be due to its excitotoxic action, since a higher influx of Ca^{2+} activates nitric oxide synthase (NOS), leading a higher production of NO. In large quantities, NO is quite unstable and can lead to the formation of reactive species of nitrogen and the radical peroxynitrite [49]. In our study, there was no change in the immuncontent of iNOS, but there may be an increase in constitutive NOS, as seen in previous studies [51]. In line with this, the protective effects of KYNA against the increased nitrite levels caused by QUIN can be by its action as a NMDA antagonist or by its antioxidant properties to scavenging peroxynitrite radicals.

We also found that QUIN impairs the mitochondrial function in striatal slices of rats, which is in agreement with other studies [52, 53]. QUIN caused an increase in MTG and MTR when compared to control group, suggesting alterations in mitochondrial mass and potential, respectively. This effect can be explained by the oxidative effect caused by QUIN, since mitochondrial membrane hyperpolarization may occur due to an overproduction of ROS. Also, the excessive production of ROS can be a consequence of the interruption of normal mitochondrial activity, causing a decrease in the respiratory chain complexes activities [54]. In line with this, KYNA prevented the increase of mitochondrial mass and membrane potential probably by its action as an antioxidant.

We further evaluated the protective effects of KYNA on complex II, succinate dehydrogenase and cytochrome c oxidase in the rat striatum slices. Treatment with QUIN decreased the activity of complex II and SDH, but did not alter cytochrome c oxidase activity, and KYNA was able to prevent these alterations. This protection is probably due its antioxidants actions, since other studies revealed mitochondrial susceptibility to damage associated with the high production of ROS after QUIN treatment [55, 56].

Considering that Na⁺,K⁺-ATPase activity is essential to maintenance of brain functions, and that other report showed that QUIN alters the activity of this enzyme in cortical astrocytes [16], we also analyzed the protective effects of KYNA on Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat striatal slices. However, KYNA was not able to prevent this effect. It is possible that the inhibition of this enzyme is associated with the decrease in sulfhydryl groups caused by QUIN since Na⁺,K⁺-ATPase is composed of many cysteine residues in the active site, and the SH-groups oxidation causes cysteine residues irreversible oxidation, causing enzyme damage [57].

Changes on oxidative stress and mitochondrial function caused by QUIN in striatal slices may be related to changes in transcription factor expression Nrf2, since it has great importance in modulating the antioxidant response. When cytoplasmatic Nrf2 translocate to the nucleus, it binds to the antioxidant response elements (ARE), activating the transcription of antioxidant enzymes such as SOD and GPx [58, 59]. In this study, exposure to QUIN caused a decrease in the cytoplasmatic and nuclear contents of Nrf2, and KYNA was able to prevent these effects. This is in agree with previous study that showed that the activation of Nrf2 is dependent on the presence of antioxidant substances [60], and can explain, at

least in part, the prevention of the decrease in the activity of the antioxidant enzymes caused by QUIN

Our results about Nrf2 are in agreement with a previous study that showed that 100 μ M QUIN decreased the nuclear Nrf2 in striatal slices after 3 h of incubation [18]. In contrast, another study from the same group showed that QUIN stimulated the Nrf2 nuclear translocation in striatal slices after 1 h of incubation [59]. These discrepancies can be explained by the molecular weight of Nrf2 evaluated in each study. In the first study they detected a 57 kDa Nrf2, similar to that used in our study, and in the second study they detected a 98 kDa Nrf2. Although Lau *et al* [61] established that the relevant form of Nrf2 is around 95-110 kDa; all these studies provide evidence supporting that Nrf2 represent a neuroprotective strategy against oxidative insults, although the role of KP metabolites in this regulation needs to be more elucidated.

Our experimental findings suggest that the protective actions triggered by KYNA on the oxidative parameters were independent on NMDA mechanisms. According to this, Hugo-Luitron *et al* [22] showed that the protective mechanisms of KYNA against the oxidative imbalance provoked by FeSO₄ were through mechanisms independent on NMDA receptors. However, it is important to point out that high KYNA concentrations have a broad-spectrum of action, including an antagonist action of AMPA receptors and α 7 cholinergic nicotine receptor [4, 12]. Therefore, we cannot exclude that other mechanisms could play a role in the protective mechanisms of KYNA actions on the striatal slices beyond the antioxidant effects, and further experiments are necessary to clarify this point.

In conclusion, we suggest that the ability of KYNA counteracting QUIN-induced cellular damage in striatal cells is directed to prevent the formation of ROS and

damage to biomolecules, influencing the activity of enzymes and antioxidant transcription factor Nrf2. In addition, our data relate the protective effect of KYNA on the reestablishment of the mitochondrial function. These results elucidate some of the effects of this metabolite as a therapeutical tool against QUIN effects, but more studies are necessary to better understand its mechanisms of action in the brain.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil).

Compliance with Ethical Standards

The ethical standards followed the official governmental guidelines issued by the Brazilian Federal of Societies for Experimental Biology, following the Guide for Care and Use of Laboratory Animals and Arouca Law (Law nº 11.794/2008) and the experimental protocol was approved by the University's Ethics Committee (CEUA) under the project #31435.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Chen Y, Guillemin GJ (2009) Kynurenine pathway metabolites in humans: Disease and healthy states. *Int J Tryptophan Res* 2:1–19. doi: 10.4137/ijtr.s2097
2. Lugo-Huitrón R, Ugalde Muñiz P, Pineda B, et al (2013) Quinolinic acid: An endogenous neurotoxin with multiple targets. *Oxid Med Cell Longev*. doi: 10.1155/2013/104024
3. Moroni F, Cozzi A, Sili M, Mannaioni G (2012) Kynurenic acid: A metabolite with multiple actions and multiple targets in brain and periphery. *J Neural Transm* 119:133–139. doi: 10.1007/s00702-011-0763-x
4. Hilmas C, Pereira EFR, Alkondon M, et al (2001) The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *J Neurosci* 21:7463–7473. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2119-01.2001
5. Fujigaki H, Yamamoto Y, Saito K (2017) L-Tryptophan-kynurenine pathway enzymes are therapeutic target for neuropsychiatric diseases: Focus on cell type differences. *Neuropharmacology* 112:264–274. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.01.011
6. Stone TW (1993) Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev* 45:309–379.
7. Guillemin GJ (2012) Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin. *FEBS J* 279:1356–1365. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08485.x
8. Cruz VPD La, Carrillo-Mora P, Santamaría A (2013) Quinolinic acid, an endogenous molecule combining excitotoxicity, oxidative stress and other toxic mechanisms. *Int J Tryptophan Res* 5:1–8. doi: 10.4137/IJTR.S8158
9. Rios C, Santamaria A (1991) Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem Res* 16:1139–1143. doi: 10.1007/BF00966592
10. Bordelon YM, Chesselet M-FF, Nelson D, et al (1997) Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum. *J Neurochem* 69:1629–1639. doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.69041629.x
11. Pierozan P, Fernandes CG, Dutra MF, et al (2014) Biochemical, histopathological and behavioral alterations caused by intrastriatal administration of quinolinic acid to young rats. *FEBS J* 281:2061–2073. doi: 10.1111/febs.12762
12. Schwarcz R, Stone TW (2017) The kynurenine pathway and the brain: Challenges, controversies and promises. *Neuropharmacology* 112:237–247. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.08.003
13. Savitz J, Drevets WC, Wurfel BE, et al (2015) Reduction of kynurenic acid to quinolinic acid ratio in both the depressed and remitted phases of major depressive disorder. *Brain Behav Immun* 46:55–59. doi: 10.1016/j.bbi.2015.02.007

14. Zádori D, Klivényi P, Vámos E, et al (2009) Kynurenines in chronic neurodegenerative disorders: Future therapeutic strategies. *J Neural Transm* 116:1403–1409. doi: 10.1007/s00702-009-0263-4
15. Parrott JM, O'Connor JC (2015) Kynurenine 3-monooxygenase: An influential mediator of neuropathology. *Front Psychiatry* 6:1–17. doi: 10.3389/fpsy.2015.00116
16. Pierozan P, Biasibetti-Brendler H, Schmitz F, et al (2017) Kynurenic Acid Prevents Cytoskeletal Disorganization Induced by Quinolinic Acid in Mixed Cultures of Rat Striatum. *Mol Neurobiol* 1–14. doi: 10.1007/s12035-017-0749-2
17. Pierozan P, Zamoner A, Soska ÁK, et al (2012) Signaling mechanisms downstream of quinolinic acid targeting the cytoskeleton of rat striatal neurons and astrocytes. *Exp Neurol* 233:391–399. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.11.005
18. Tasset I, Pérez-De La Cruz V, Elinos-Calderón D, et al (2010) Protective effect of tert-butylhydroquinone on the quinolinic-acid-induced toxicity in rat striatal slices: Role of the Nrf2-antioxidant response element pathway. *NeuroSignals* 18:24–31. doi: 10.1159/000243650
19. Holmström KM, Kostov R V., Dinkova-Kostova AT (2017) The multifaceted role of Nrf2 in mitochondrial function. *Curr Opin Toxicol* 2:80–91. doi: 10.1016/j.cotox.2016.10.002
20. Schmitz F, Pierozan P, Rodrigues AF, et al (2016) Methylphenidate Decreases ATP Levels and Impairs Glutamate Uptake and Na⁺,K⁺-ATPase Activity in Juvenile Rat Hippocampus. *Mol Neurobiol* 1–12. doi: 10.1007/s12035-016-0289-1
21. Schweinberger BM, Schwieder L, Scherer E, et al (2014) 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. *Metab Brain Dis* 29:153–60. doi: 10.1007/s11011-013-9451-x
22. Lugo-Huitrón R, Blanco-Ayala T, Ugalde-Muñiz P, et al (2011) On the antioxidant properties of kynurenic acid: Free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicol Teratol* 33:538–547. doi: 10.1016/j.ntt.2011.07.002
23. Hardeland R, Zsizsik B, Poeggeler B, et al (1999) Indole-3-pyruvic and -propionic acids, kynurenic acid, and related metabolites as luminophores and free-radical scavengers. *Adv Exp Med Biol* 467:389–395.
24. Filpa V, Carpanese E, Marchet S, et al (2015) Interaction between NMDA glutamatergic and nitrergic enteric pathways during in vitro ischemia and reperfusion. *Eur J Pharmacol* 750:123–131. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.01.021
25. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992) Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chem Res Toxicol* 5:227–231. doi: 10.1021/tx00026a012
26. Ignarro LJ, Fukuto JM, Griscavage JM, et al (1993) Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8103–8107. doi: 10.1073/pnas.90.17.8103

27. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131–138. doi: 10.1016/0003-2697(82)90118-X
28. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358. doi: 10.1016/0003-2697(79)90738-3
29. Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302:141–145. doi: 10.1016/S0304-3940(01)01636-6
30. MARKLUND S, MARKLUND G (1974) Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *Eur J Biochem* 47:469–474. doi: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x
31. Aebi H (1984) [13] Catalase in Vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126. doi: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3
32. Wendel A (1981) Glutathione Peroxidase. *Methods Enzymol* 77:325–333. doi: 10.1016/S0076-6879(81)77046-0
33. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184–191. doi: 10.1016/0014-4827(88)90265-0
34. Tice RR, Agurell E, Anderson D, et al (2000) Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. In: *Environ. Mol. Mutagen.* pp 206–221
35. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, et al (2003) Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18:45–51. doi: 10.1093/mutage/18.1.45
36. Wyse AT, Streck EL, Barros S V, et al (2000) Methylmalonate administration decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in cerebral cortex of rats. *Neuroreport* 11:2331–4.
37. Chan KM, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺ -stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375–80. doi: 10.1016/0003-2697(86)90640-8
38. Agnello M, Morici G, Rinaldi AM (2008) A method for measuring mitochondrial mass and activity. *Cytotechnology* 56:145–149. doi: 10.1007/s10616-008-9143-2
39. Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, et al (1985) Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 153:23–36. doi: 10.1016/0009-8981(85)90135-4
40. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, et al (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 228:35–51. doi: 10.1016/0009-8981(94)90055-8

41. Biasibetti H, Pierozan P, Rodrigues AF, et al (2017) Hypoxanthine Intrastratial Administration Alters Neuroinflammatory Profile and Redox Status in Striatum of Infant and Young Adult Rats. *Mol Neurobiol* 54:2790–2800. doi: 10.1007/s12035-016-9866-6
42. Biasibetti-Brendler H, Schmitz F, Pierozan P, et al (2017) Hypoxanthine Induces Neuroenergetic Impairment and Cell Death in Striatum of Young Adult Wistar Rats. *Mol Neurobiol* 1–9. doi: 10.1007/s12035-017-0634-z
43. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
44. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275. doi: 10.1016/0304-3894(92)87011-4
45. Baird L, Dinkova-Kostova AT (2011) The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol* 85:241–272. doi: 10.1007/s00204-011-0674-5
46. Pérez-González A, Alvarez-Idaboy JR, Galano A (2015) Free-radical scavenging by tryptophan and its metabolites through electron transfer based processes. *J Mol Model*. doi: 10.1007/s00894-015-2758-2
47. Dure IV LS, Wiess S, Standaert DG, et al (1995) DNA Fragmentation and Immediate Early Gene Expression in Rat Striatum Following Quinolinic Acid Administration. *Exp Neurol* 133:207–214. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/exnr.1995.1023>
48. Bordelon YM, MacKenzie L, Chesselet MF (1999) Morphology and compartmental location of cells exhibiting DNA damage after quinolinic acid injections into rat striatum. *J Comp Neurol* 412:38–50. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19990913)412:1<38::AID-CNE3>3.0.CO;2-6
49. Braidy N, Grant R, Adams S, Guillemin GJ (2010) Neuroprotective effects of naturally occurring polyphenols on quinolinic acid-induced excitotoxicity in human neurons. *FEBS J* 277:368–382. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07487.x
50. Lu LY, Ou N, Lu Q-B (2013) Antioxidant Induces DNA Damage, Cell Death and Mutagenicity in Human Lung and Skin Normal Cells. *Sci Rep* 3:3169. doi: 10.1038/srep03169
51. Santamaría A, Santamaría D, Díaz-Muñoz M, et al (1997) Effects of Nw-nitro-L-arginine and L-arginine on quinolinic acid-induced lipid peroxidation. *Toxicol Lett* 93:117–124. doi: 10.1016/S0378-4274(97)00082-9
52. Luis-García ER, Limón-Pacheco JH, Serrano-García N, et al (2017) Sulforaphane prevents quinolinic acid-induced mitochondrial dysfunction in rat striatum. *J Biochem Mol Toxicol*. doi: 10.1002/jbt.21837
53. Mishra J, Kumar A (2014) Improvement of Mitochondrial Function by Paliperidone Attenuates Quinolinic Acid-Induced Behavioural and Neurochemical Alterations in Rats: Implications in Huntington's Disease. *Neurotox Res* 26:363–381. doi: 10.1007/s12640-014-9469-9

54. Hariharan A, Shetty S, Shirole T, Jagtap AG (2014) Potential of protease inhibitor in 3-nitropropionic acid induced Huntington's disease like symptoms: Mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Neurotoxicology* 45:139–148. doi: 10.1016/j.neuro.2014.10.004
55. Rodríguez-Martínez E, Camacho A, Maldonado PD, et al (2000) Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. *Brain Res* 858:436–439. doi: 10.1016/S0006-8993(99)02474-9
56. Pérez-Severiano F, Rodríguez-Pérez M, Pedraza-Chaverrí J, et al (2004) S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. *Neurochem Int* 45:1175–1183. doi: 10.1016/j.neuint.2004.06.008
57. Dergousova EA, Petrushanko IY, Klimanova EA, et al (2017) Effect of reduction of redox modifications of cys-residues in the Na,K-ATPase α 1-subunit on its activity. *Biomolecules*. doi: 10.3390/biom7010018
58. Chapple SJ, Siow RCM, Mann GE (2012) Crosstalk between Nrf2 and the proteasome: Therapeutic potential of Nrf2 inducers in vascular disease and aging. *Int J Biochem Cell Biol* 44:1315–1320. doi: 10.1016/j.biocel.2012.04.021
59. Colín-González AL, Luna-López A, Königsberg M, et al (2014) Early modulation of the transcription factor Nrf2 in rodent striatal slices by quinolinic acid, a toxic metabolite of the kynurenine pathway. *Neuroscience* 260:130–139. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.12.025
60. Gokila Vani M, Kumar KJS, Liao JW, et al (2013) Antcin C from *Antrodia cinnamomea* protects liver cells against free radical-induced oxidative stress and apoptosis in vitro and in vivo through nrf2-dependent mechanism. *Evidence-based Complement Altern Med*. doi: 10.1155/2013/296082
61. Lau A, Tian W, Whitman SA, Zhang DD (2013) The Predicted Molecular Weight of Nrf2: It Is What It Is Not. *Antioxid Redox Signal* 18:91–93. doi: 10.1089/ars.2012.4754

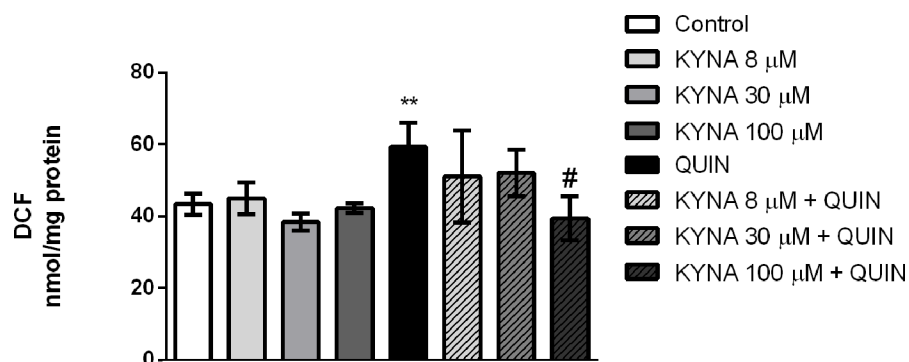


Fig. 1 Effect of different doses of KYNA on striatum slices QUIN-treated on H₂DCF oxidation. Results are expressed as nanomole per milligram of protein. Data are mean \pm SD for 6-7 animals per group. **p <0.01 compared to control group; #p <0.05 compared to QUIN group (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test)

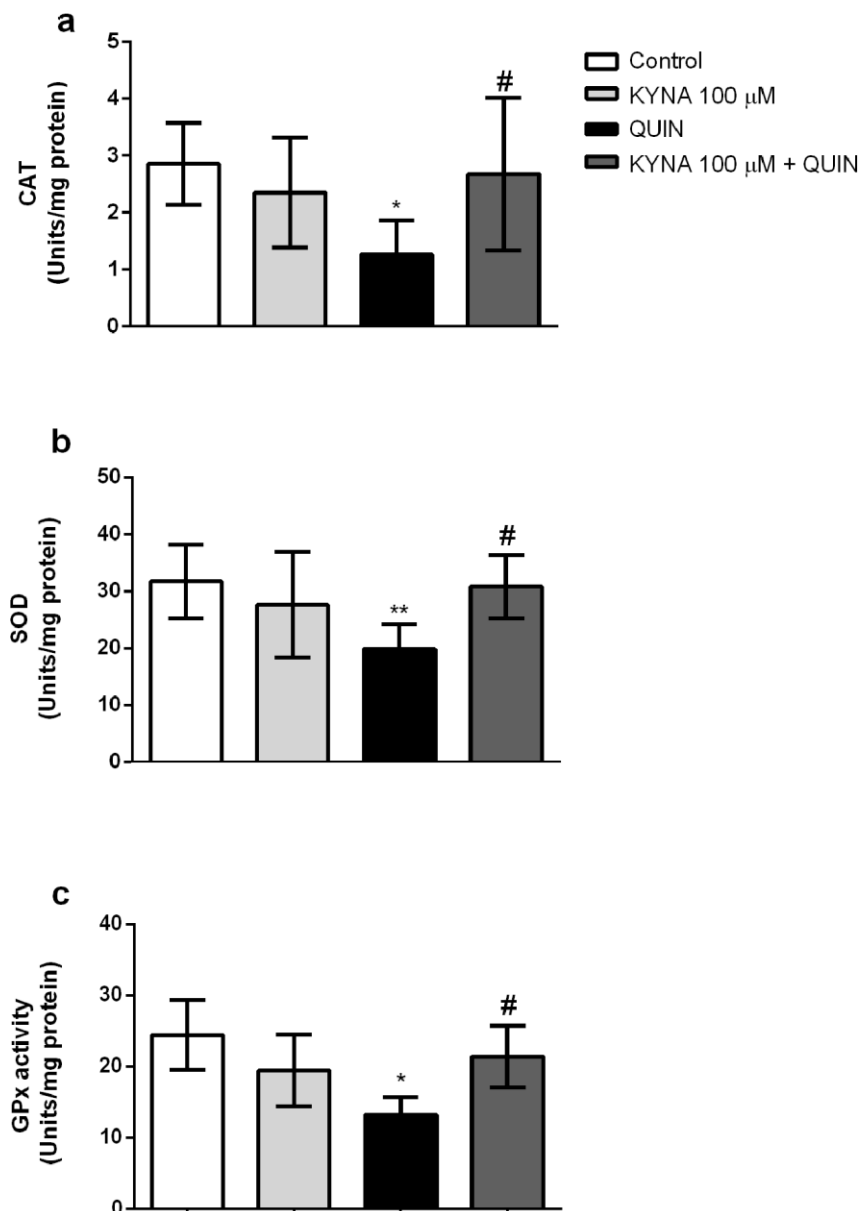


Fig. 2 Effect of KYNA on striatum slices QUIN-treated on antioxidant enzymes. Results are expressed as units per milligram of protein. CAT activity (a), SOD activity (b) and GPx activity (c). Results are expressed as mean \pm S.D. for 6–7 animals per group. * p < 0.05, ** p < 0.01 compared to control group; # p < 0.05 compared to QUIN group (two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test)

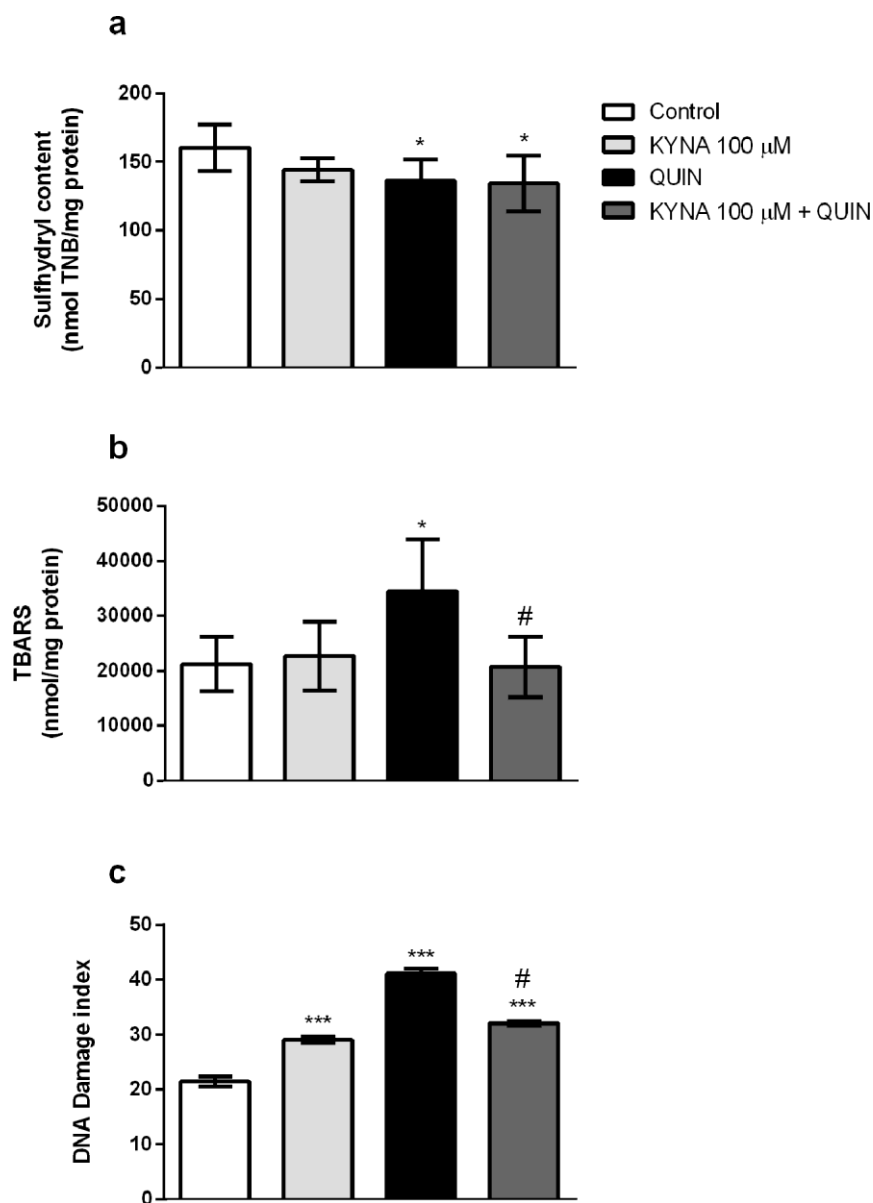


Fig. 3 Effect of KYNA on striatum slices QUIN-treated on oxidative parameters. Sulphydryl content (a), TBARS (b) and DNA damage (c). Results are expressed as mean \pm S.D. for 6–7 animals per group. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 compared to control group; # p <0.05 compared to QUIN group (two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test)

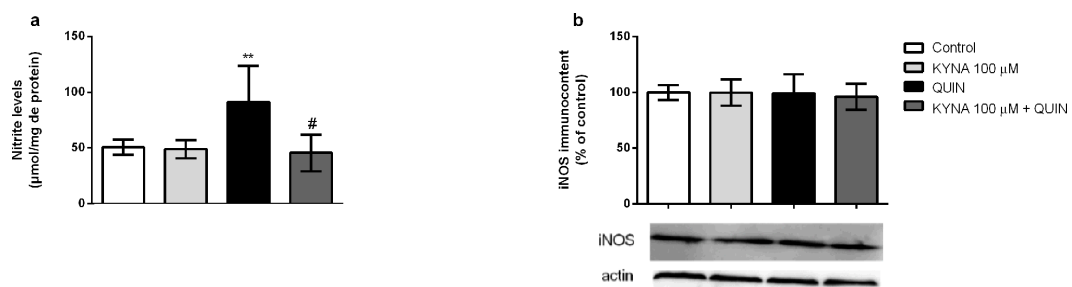


Fig. 4 Effect of KYNA on striatum slices QUIN-treated on nitrite levels (a), and iNOS immunocontent (b). Results are expressed as mean \pm S.D. for 6 animals per group. **p < 0.01, compared to control group; #p < 0.05 compared to QUIN group (two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test)

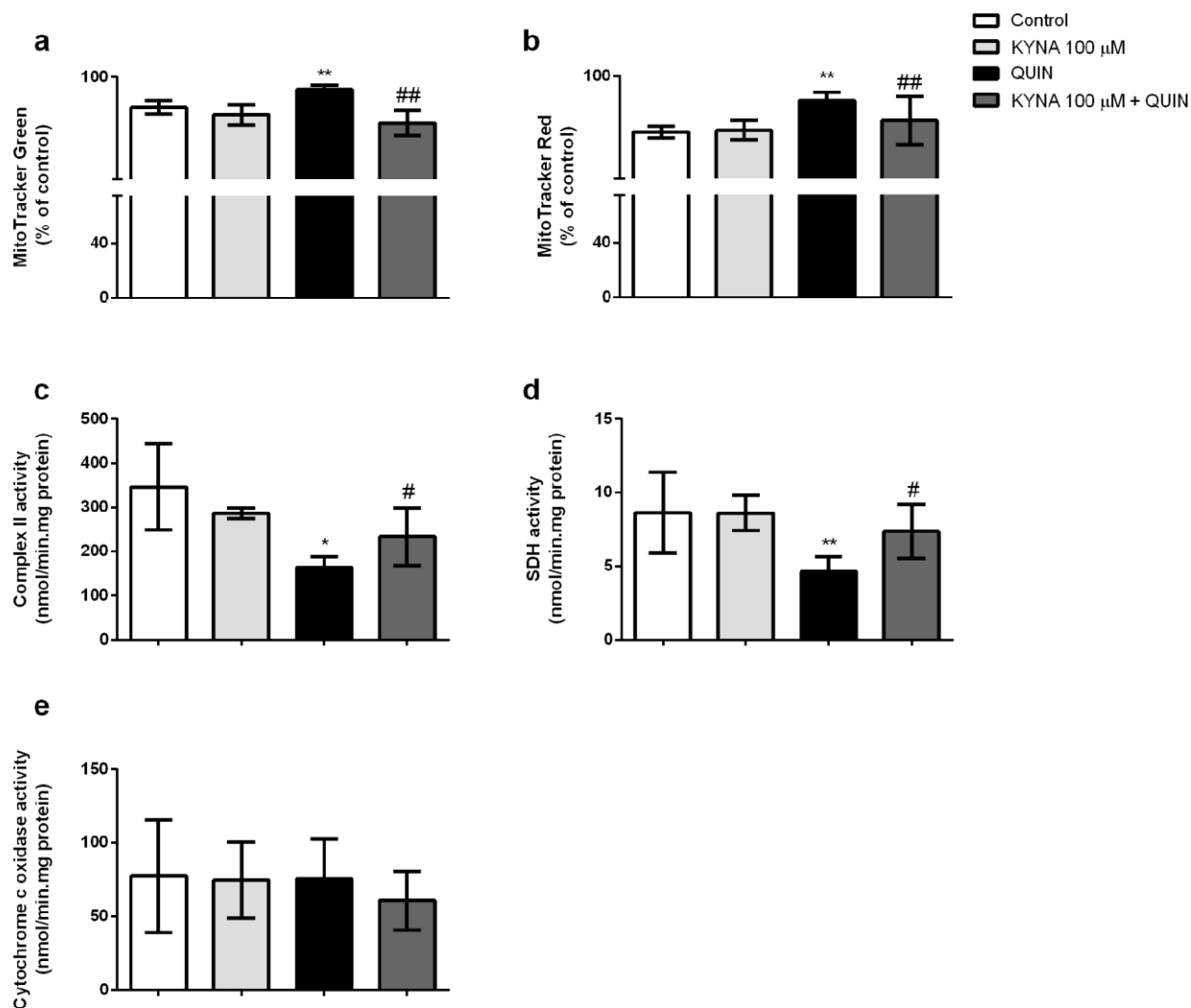


Fig. 5 Effect of KYNA on striatum slices QUIN-treated on on mitochondrial mass (a), membrane potential (b), Complex II activity (c), SDH activity (d) and Cytochrome c oxidase activity (e). Results are expressed as percentage of control or nmol per min per mg of protein. Data are mean \pm SD for 6 animals per group. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, compared to control group; # p < 0.05 compared to QUIN group (two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test)

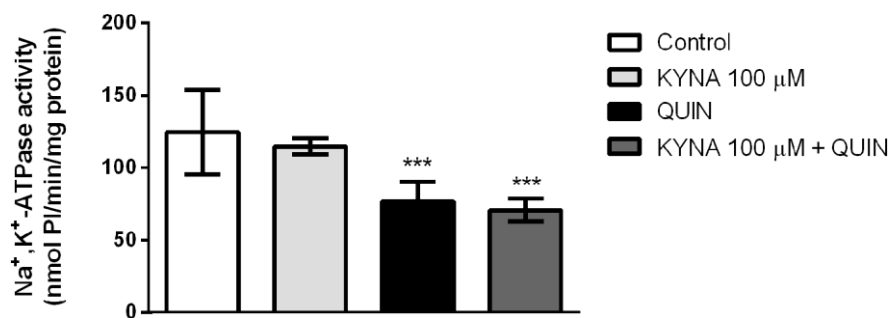


Fig. 6 Effect of KYNA on striatum slices QUIN-treated on Na⁺,K⁺-ATPase activity. Results are expressed as mean \pm SD for 6 animals per group. ***p <0.001 compared to control group (two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test)

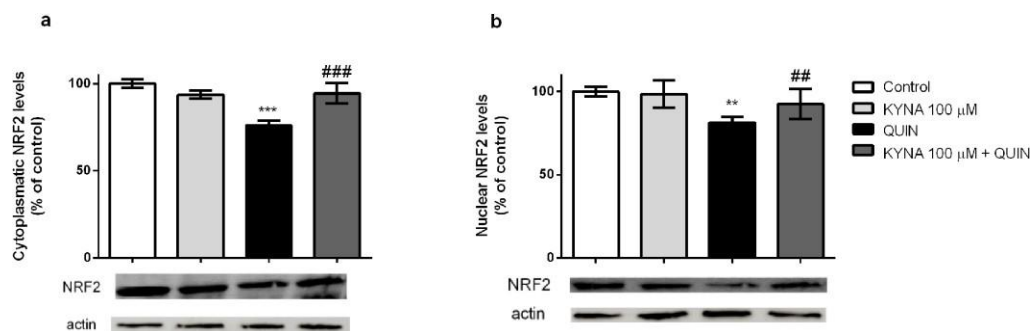


Fig. 7 Effect of KYNA on striatum slices QUIN-treated on cytoplasmic (a) and nuclear (b) NRF2 levels. Results are expressed as percentage of control. Results are expressed as mean \pm S.D. for 6 animals per group. **p <0.01, ***p <0.001 compared to control group; #p <0.05 compared to QUIN group (two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test)

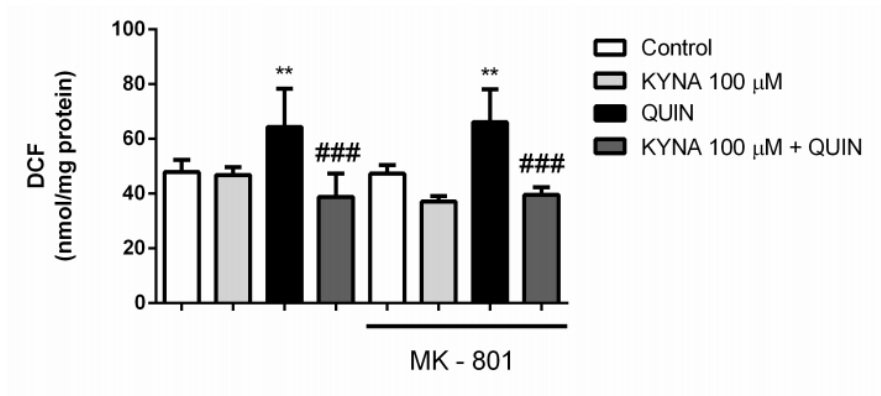


Fig. 8 Evaluation of NMDA receptors on the actions of KYNA on QUIN-induced DCF production. Results are expressed as nanomole per milligram of protein. Results are expressed as mean \pm S.D. for 6 animals per group. ** $p < 0.01$ compared to control group; ### $p < 0.001$ compared to QUIN or MK-801+QUIN group (two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test).

4 DISCUSSÃO

O ácido quinolínico é um metabólito resultante da conversão do triptofano pela via das quinureninas e que em condições fisiológicas da célula, participa da formação de NAD⁺ (Jeon & Kim, 2017). Porém, em condições patológicas, há um aumento nas suas concentrações no SNC, desencadeando efeitos deletérios. QUIN está relacionado a desordens como a demência, as Doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington, demência, entre outras, causando diversos efeitos tóxicos às células por mecanismos diversos, como excitotoxicidade, aumento na produção de radicais livres e citocinas pró-inflamatórias (Guillemin, 2012). KYNA, também produzido pela via das quinureninas, age como antagonista de receptores glutamatérgicos e colinérgicos, além de possuir propriedades antioxidantes. Alterações na sua concentração cerebral estão relacionadas a diversas desordens neurodegenerativas. Seus níveis estão diminuídos na fase terminal da Doença de Parkinson (Ogawa et al., 1992) e também na Doença de Huntington (Beal et al., 1990). Estudos realizados em modelos utilizando animais reforçam que o aumento dos níveis do metabólito exerce efeito neuroprotetor, anticonvulsivante e diminui a vulnerabilidade neuronal (Moroni et al., 2012). Uma diminuição na razão KYNA/QUIN está bastante relacionada ao surgimento de prejuízos celulares (Schwarcz and Stone, 2017), porém os mecanismos pelos quais esses eventos acontecem ainda não bem elucidados.

Sendo assim, o objetivo do nosso trabalho foi investigar os possíveis efeitos protetores exercidos por KYNA frente aos insultos causados por QUIN sobre parâmetros de estresse oxidativo, função mitocondrial e a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em fatias de estriado de ratos Wistar jovens.

Estudos anteriores demonstram que a ação excitotóxica de QUIN (Stone, 1993) leva a um aumento na formação de ERO em diversas estruturas cerebrais (Guillemin, 2012), e sabendo que KYNA pode exercer seus efeitos protetores por diferentes mecanismos de ação e em diferentes doses (Moroni et al., 2012), inicialmente foi realizada uma curva de dose para verificar qual dose do metabólito seria mais adequada para prevenir danos causados por QUIN à homeostase redox das células. Fatias de estriado foram incubadas com QUIN 100 μM e/ou KYNA nas concentrações de 8 μM (antagonista colinérgico), 30 μM (antagonista glutamatérgico) e 100 μM (antioxidante). Como esperado, a concentração de 100 μM foi eficiente prevenindo o aumento de ERO causado por QUIN, confirmando seu potencial como agente sequestrador de espécies reativas.

A partir do aumento de ERO observado no experimento realizado para curva de dose de KYNA, investigamos a atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx em nosso modelo. A ação de QUIN diminuiu as atividades dessas enzimas, contribuindo com a manutenção do um estado pró oxidativo ao passo que KYNA foi capaz de prevenir essas alterações.

Sabe-se que, em situações de estresse oxidativo, onde existe um desbalanço entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes, as espécies reativas podem atacar diretamente biomoléculas (Kryston et al., 2011), em nosso estudo, observamos que há uma diminuição nos conteúdos de sulfidrilas, sugerindo danos aos grupamentos tiol (-SH) de proteínas, bem como um aumento nas espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), sugerindo então peroxidação lipídica. Esses danos são característicos das ações de QUIN (Kalonja et al., 2012; Sadeghnia et al., 2013), confirmando que o metabólito

produz danos oxidativos em altas concentrações (Kalonía et al., 2012). Neste contexto, estudos sugerem que os danos a biomoléculas causados por QUIN são decorrentes da inibição das enzimas antioxidantes (Antunes Wilhelm et al., 2013). KYNA preveniu a peroxidação lipídica, mas não foi capaz de prevenir a diminuição no conteúdo de sulfidrilas.

Além de verificar danos a proteínas e lipídios, no presente trabalho também foi investigado possível dano ao DNA. O teste cometa permite avaliar o dano ao DNA cromossômico em relação a sua migração (Speit and Hartmann, 2006). Foi observado que QUIN também levou a danos pronunciados ao DNA. Esse efeito deletério pode estar correlacionado a sua ação como agonista de receptores NMDA e aos danos oxidativos gerados pelo mesmo. Sabe-se que um aumento de ERO está intrinsecamente relacionado a danos ao DNA, por mecanismos de oxidação de ácidos nucleicos ou quebra de ligações. Estudos anteriores demonstram que QUIN, mesmo em pequenas doses, leva à fragmentação do DNA (Bordelon et al., 1999; Dure IV et al., 1995), e que esses danos se devem aos efeitos excitotóxicos de QUIN (Bordelon et al., 1999) e da formação de espécies reativas (Braidý et al., 2010). As fatias tratadas com KYNA e QUIN tiveram o índice de dano parcialmente diminuído quando comparado ao tratamento com QUIN. KYNA, *per se*, levou a um pequeno aumento no índice de dano, necessitando estudos posteriores para elucidação de tais resultados.

O óxido nítrico (NO) é uma molécula importante em diversos processos fisiológicos, incluindo neurotransmissão, regulação da pressão arterial, relaxamento do músculo liso, entre outros. No entanto, em concentrações elevadas, NO age como um radical livre, induzindo estresse oxidativo e consequentemente, danos a biomoléculas (Huang et al., 2017). Em nosso

estudo, verificamos os níveis de nitritos nas fatias tratadas com QUIN e/ou KYNA. QUIN levou a um aumento nos níveis de nitritos, e possivelmente este é um efeito característico da ação do metabólito devido à sua ação excitotóxica (Braidy et al., 2010). Com um maior influxo de Ca^{2+} , há uma maior ativação de óxido nítrico sintases (NOS), e uma maior produção de NO. Em grandes quantidades, esses radicais são bastante instáveis e podem levar a formação de espécies reativas de nitrogênio e do radical peroxinitrito (Braidy et al., 2010). Uma vez que a enzima iNOS é responsável por catalisar a formação de NO através de estímulos inflamatórios e oxidativos, analisamos também o seu imunoconteúdo. Curiosamente, não houve alteração de imunoconteúdo de iNOS. Sabe-se que a óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS) é dependente de Ca^{2+} para sua ativação. Possivelmente, o aumento de Ca^{2+} gerado por QUIN levou a um aumento da ativação da cNOS, o que poderia justificar o aumento nos níveis de nitritos encontrados (Santamaría et al., 1997). KYNA foi capaz de prevenir o aumento nos níveis de nitritos.

As mitocôndrias possuem uma importância vital para a manutenção da viabilidade celular. Através das reações da cadeia transportadora de elétrons, ocorre a síntese de ATP, de essencial importância para a manutenção de diversos processos celulares, como a neurotransmissão. O comprometimento das funções mitocondriais está envolvido com o envelhecimento cerebral e com desordens neurodegenerativas (Luis-García et al., 2017). Estudos anteriores demonstram a influência de QUIN sobre o metabolismo energético cerebral, provocando alterações na cadeia respiratória e nos níveis de ATP (Sas et al., 2007). Em nosso estudo, avaliamos a atividade da enzima SDH, uma enzima localizada na membrana mitocondrial interna e responsável por transferir

elétrons diretamente para a cadeia transportadora de elétrons. O tratamento com QUIN diminuiu a atividade enzimática, corroborando estudos anteriores (Cruz et al., 2013; Zádori et al., 2012). Os efeitos de QUIN sobre a atividade do complexo II mitocondrial também foram analisados. O complexo II é um componente essencial da fosforilação oxidativa, e em nosso trabalho, sua atividade encontra-se diminuída na presença de QUIN. Esses achados estão de acordo com estudos anteriores (Zádori et al., 2012) e a inibição de atividade do complexo II e da SDH podem levar a uma redução incompleta do oxigênio, aumentando a formação de radicais livres, além de reduzir a síntese de ATP (Li et al., 2006; Stowe and Camara, 2009). KYNA foi capaz de prevenir a diminuição na atividade das duas enzimas. A atividade do complexo IV (citocromo c oxidase) também foi avaliada, porém não apresentou alterações em relação ao grupo controle.

A integridade da mitocôndria é fundamental para a manutenção de suas funções. Disfunções mitocondriais afetam a produção de ATP, levando à produção de radicais livres e, conseqüentemente, prejudicando o metabolismo celular (Biasibetti-Brendler et al., 2017). Para melhor compreender o efeito de QUIN e/ou KYNA sobre a função mitocondrial, analisamos a massa mitocondrial e potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$), vistos pela marcação com MitoTracker Green e MitoTracker Red, respectivamente. O tratamento de fatias do estriado com QUIN gerou um aumento de MitoTracker Green e MitoTracker Red em relação ao grupo controle, demonstrando alterações na massa e no potencial de membrana mitocondrial. A hiperpolarização da membrana mitocondrial deve-se a um excesso de produção de ERO. Possivelmente, com a diminuição da atividade dos complexos da cadeia respiratória também

encontrada neste trabalho, há uma interrupção da atividade mitocondrial normal, o que leva à produção excessiva de ROS, com consequente hiperpolarização da membrana mitocondrial (Hariharan et al., 2014). KYNA preveniu o aumento de massa e potencial de membrana mitocondrial, não apresentando efeitos *per se* na avaliação desses parâmetros.

Na^+, K^+ -ATPase é uma proteína integral de membrana responsável pela manutenção do gradiente eletroquímico celular, realizando o transporte de íons Na^+ para dentro da célula e íons K^+ para fora da célula, e com isso, exercendo importante papel na excitabilidade neuronal e no transporte de moléculas e neurotransmissores. (Schmitz et al., 2016) Sua atividade é altamente suscetível ao aumento de ROS, peroxidação lipídica e à oxidação de grupamentos sulfidríla (Schweinberger et al., 2014), sendo que a desregulação de sua atividade pode induzir danos significativos nas funções cerebrais e a inibição de sua atividade é encontrada em diversas doenças que afetam o SNC (Schmitz et al., 2016; Wyse et al., 1999). Devido a sua importância na manutenção das funções cerebrais, foi avaliado o efeito de QUIN sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em fatias de estriado de ratos. QUIN diminuiu a atividade dessa enzima e KYNA não foi capaz de prevenir esse efeito. É possível que a inibição da atividade enzimática esteja associada à diminuição dos grupos sulfidríla causada por QUIN, uma vez que a Na^+, K^+ -ATPase possui grupamentos cisteína em seu sítio ativo, e com a oxidação dos grupamentos tiol há uma consequente oxidação irreversível dos resíduos de cisteína, causando danos enzimáticos (Dergousova et al., 2017).

Nrf2 é um fator de transcrição essencial na resposta antioxidante do organismo, além de estar envolvido em processos essenciais a manutenção da homeostasia celular, como por exemplo, manutenção da função mitocondrial

(Holmström et al., 2017). Quando há a translocação do Nrf2 citoplasmático (inativo) para o núcleo, há uma ligação aos ARE, ativando a transcrição de enzimas antioxidantes como CAT, SOD e GPx (Baird & Dinkova-Kostova, 2011b; Holmström et al., 2017). Sabendo de sua importância como modulador fundamental da fisiologia celular, nosso estudo analisou os níveis de Nrf2 citoplasmático e nuclear em fatias de estriado tratadas com QUIN e/ou KYNA. A exposição das fatias ao QUIN levou à uma diminuição nos níveis de Nrf2 tanto citoplasmático quanto nuclear. A redução no conteúdo deste fator de transcrição possivelmente está correlacionada à diminuição na atividade de enzimas antioxidantes, resultando na manutenção do dano oxidativo. KYNA foi capaz de prevenir a diminuição dos níveis de Nrf2 na presença de QUIN por sua ação antioxidante. Estudos anteriores demonstram que a ativação de Nrf2 é dependente da presença de substâncias antioxidantes (Gokila Vani et al., 2013). Tomados em conjunto, os resultados do presente trabalho auxiliam a elucidar os mecanismos de toxicidade induzida pelo QUIN em fatias de estriado de ratos Wistar jovens. O tratamento com QUIN aumentou a produção de EROs, diminuindo as atividades de enzimas antioxidantes e, conseqüentemente, gerando danos a biomoléculas. Além disso, QUIN causou disfunção mitocondrial e comprometimento da cadeia transportadora de elétrons, levando também a uma diminuição da Na⁺,K⁺-ATPase. É possível que esses danos sejam resultados da ação de QUIN sobre Nrf2, importante fator de transcrição envolvido na manutenção da homeostasia celular.

Por outro lado, KYNA, com sua ação antioxidante, preveniu grande parte dos danos causados, mostrando-se uma opção interessante na investigação de possíveis estratégias protetoras aos danos causados por QUIN. Contudo, mais

estudos são necessários para elucidar sua eficácia.

5 CONCLUSÕES

- **O tratamento com QUIN nas fatias de estriado de ratos jovens:**
 - ✓ Aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio;
 - ✓ Diminuiu a atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx;
 - ✓ Diminuiu o conteúdo total de sulfidrilas;
 - ✓ Aumentou os níveis de TBARS;
 - ✓ Aumentou o índice de dano ao DNA;
 - ✓ Aumentou os níveis de nitritos;
 - ✓ Aumentou a massa mitocondrial e o potencial de membrana mitocondrial;
 - ✓ Reduziu a atividade do complexo II mitocondrial e da SDH
 - ✓ Diminuiu a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase
 - ✓ Reduziu os níveis de Nrf2 citoplasmático e nuclear.
- **A administração de KYNA foi capaz de prevenir os seguintes parâmetros:**
 - ✓ O aumento de espécies reativas de oxigênio;
 - ✓ A redução da atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx;
 - ✓ O aumento os níveis de TBARS;
 - ✓ O aumento nos níveis de nitritos;

- ✓ O aumento da massa mitocondrial e do potencial de membrana mitocondrial;
 - ✓ A alteração na atividade do complexo II e da SDH;
 - ✓ A diminuição nos níveis de Nrf2.
- O tratamento com KYNA *per se* em fatias de ratos Wistar jovens:
 - ✓ Aumentou o índice de dano ao DNA.

Tomados em conjunto, os resultados apresentados no presente trabalho sugerem que o KYNA desempenha um papel protetor em relação aos danos causados por QUIN em fatias de estriado de ratos Wistar jovens, atuando na prevenção de alterações no status oxidativo e nas funções mitocondriais. Esses estudos permitem a elucidação de alguns dos efeitos desses metabólitos na homeostase celular, porém mais estudos são necessários para uma melhor compreensão de seus mecanismos de ação no cérebro.

6 PERSPECTIVAS

A fim de melhor compreender os mecanismos pelos quais KYNA exerce efeito neuroprotetor frente aos danos causados por QUIN, temos como perspectivas:

- Desenvolver um modelo de estudo *in vivo* em ratos Wistar jovens;
- Avaliação de parâmetros pró e anti-inflamatórios;
- Investigação de vias de sinalização relacionadas à sobrevivência celular;
- Investigar o papel dos receptores glutamatérgicos na ação de KYNA e QUIN.

7 REFERÊNCIAS

- Antunes Wilhelm, E., Ricardo Jesse, C., Folharini Bortolatto, C., Wayne Nogueira, C., 2013. Correlations between behavioural and oxidative parameters in a rat quinolinic acid model of Huntington's disease: Protective effect of melatonin. *Eur. J. Pharmacol.* 701, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.01.007>
- Aperia, A., 2007. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target, in: *Journal of Internal Medicine*. pp. 44–52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2006.01745.x>
- Badawy, A.A.B., 2017. Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects. *Int. J. Tryptophan Res.* <https://doi.org/10.1177/1178646917691938>
- Baird, L., Dinkova-Kostova, A.T., 2011a. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch. Toxicol.* 85, 241–272. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0674-5>
- Baird, L., Dinkova-Kostova, A.T., 2011b. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch. Toxicol.* <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0674-5>
- Bavaresco, C.S., Chiarani, F., Wannmacher, C.M.D., Netto, C.A., Wyse, A.T.S. De, 2007. Intrastratial hypoxanthine reduces Na⁺,K⁺-ATPase activity and induces oxidative stress in the rats. *Metab. Brain Dis.* 22, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11011-006-9037-y>
- Beal, M.F., Matson, W.R., Swartz, K.J., Gamache, P.H., Bird, E.D., 1990. Kynurenine Pathway Measurements in Huntington's Disease Striatum: Evidence for Reduced Formation of Kynurenic Acid. *J. Neurochem.* 55, 1327–1339. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb03143.x>
- Biasibetti-Brendler, H., Schmitz, F., Pierozan, P., Zanotto, B.S., Prezzi, C.A., de Andrade, R.B., Wannmacher, C.M.D., Wyse, A.T.S., 2017. Hypoxanthine Induces Neuroenergetic Impairment and Cell Death in Striatum of Young Adult Wistar Rats. *Mol. Neurobiol.* 1–9. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0634-z>
- Bordelon, Y.M., MacKenzie, L., Chesselet, M.F., 1999. Morphology and compartmental location of cells exhibiting DNA damage after quinolinic acid injections into rat striatum. *J. Comp. Neurol.* 412, 38–50. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19990913\)412:1<38::AID-CNE3>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19990913)412:1<38::AID-CNE3>3.0.CO;2-6)
- Braidy, N., Grant, R., Adams, S., Guillemin, G.J., 2010. Neuroprotective effects of naturally occurring polyphenols on quinolinic acid-induced excitotoxicity in human neurons. *FEBS J.* 277, 368–382. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07487.x>

- Chen, Y., Brew, B.J., Guillemin, G.J., 2011. Characterization of the kynurenine pathway in NSC-34 cell line: Implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 118, 816–825. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07159.x>
- Cozzi, A., Carpenedo, R., Moroni, F., 1999. Kynurenine hydroxylase inhibitors reduce ischemic brain damage: studies with (m-nitrobenzoyl)-alanine (mNBA) and 3,4-dimethoxy-[N-4-(nitrophenyl)thiazol-2yl]-benzenesulfonamide (Ro 61-8048) in models of focal or global brain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19, 771–7. <https://doi.org/10.1097/00004647-199907000-00007>
- Cruz, V.P.D. La, Carrillo-Mora, P., Santamaría, A., 2013. Quinolinic acid, an endogenous molecule combining excitotoxicity, oxidative stress and other toxic mechanisms. *Int. J. Tryptophan Res.* <https://doi.org/10.4137/IJTR.S8158>
- Dergousova, E.A., Petrushanko, I.Y., Klimanova, E.A., Mitkevich, V.A., Ziganshin, R.H., Lopina, O.D., Makarov, A.A., 2017. Effect of reduction of redox modifications of cys-residues in the Na,K-ATPase α 1-subunit on its activity. *Biomolecules* 7. <https://doi.org/10.3390/biom7010018>
- Dure IV, L.S., Wiess, S., Standaert, D.G., Rudolf, G., Testa, C.M., Young, A.B., 1995. DNA Fragmentation and Immediate Early Gene Expression in Rat Striatum Following Quinolinic Acid Administration. *Exp. Neurol.* 133, 207–214. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1006/exnr.1995.1023>
- Ferreira, A.G.K., Stefanello, F.M., Cunha, A. a, da Cunha, M.J., Pereira, T.C.B., Bonan, C.D., Bogo, M.R., Netto, C. a, Wyse, A.T.S., 2011. Role of antioxidants on Na(+),K (+)-ATPase activity and gene expression in cerebral cortex of hyperprolinemic rats. *Metab. Brain Dis.* 26, 141–7. <https://doi.org/10.1007/s11011-011-9243-0>
- Fujigaki, H., Yamamoto, Y., Saito, K., 2017. L-Tryptophan-kynurenine pathway enzymes are therapeutic target for neuropsychiatric diseases: Focus on cell type differences. *Neuropharmacology.* <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.01.011>
- Gokila Vani, M., Kumar, K.J.S., Liao, J.W., Chien, S.C., Mau, J.L., Chiang, S.S., Lin, C.C., Kuo, Y.H., Wang, S.Y., 2013. Antcin C from *Antrodia cinnamomea* protects liver cells against free radical-induced oxidative stress and apoptosis in vitro and in vivo through Nrf2-dependent mechanism. Evidence-based Complement. Altern. Med. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/296082>
- Goldstein, I., Levy, T., Galili, D., Ovadia, H., Yirmiya, R., Rosen, H., Lichtstein, D., 2006. Involvement of Na⁺, K⁺-ATPase and Endogenous Digitalis-Like Compounds in Depressive Disorders. *Biol. Psychiatry* 60, 491–499. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.12.021>
- Guidetti, P., Luthi-Carter, R.E., Augood, S.J., Schwarcz, R., 2004. Neostriatal

- and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* 17, 455–461. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.07.006>
- Guillemin, G.J., 2012. Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin. *FEBS J.* <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08485.x>
- Guillemin, G.J., Wang, L., Brew, B.J., 2005. Quinolinic acid selectively induces apoptosis of human astrocytes: potential role in AIDS dementia complex. *J. Neuroinflammation* 2, 16. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-2-16>
- Halliwell, B., 2012. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutr. Rev.* 70, 257–265. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x>
- Halliwell, B., 2011. Free radicals and antioxidants - Quo vadis? *Trends Pharmacol. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.12.002>
- Halliwell, B., 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.* 52, 253–265. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1994.tb01453.x>
- Hariharan, A., Shetty, S., Shirole, T., Jagtap, A.G., 2014. Potential of protease inhibitor in 3-nitropropionic acid induced Huntington's disease like symptoms: Mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Neurotoxicology* 45, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.10.004>
- Hilmas, C., Pereira, E.F.R., Alkondon, M., Rassoulpour, A., Schwarcz, R., Albuquerque, E.X., 2001. The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *J. Neurosci.* 21, 7463–7473. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2119-01.2001> [pii]
- Holmström, K.M., Kostov, R. V., Dinkova-Kostova, A.T., 2017. The multifaceted role of Nrf2 in mitochondrial function. *Curr. Opin. Toxicol.* 2, 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2016.10.002>
- Huang, D., Cui, L., Guo, P., Xue, X., Wu, Q., Hussain, H.I., Wang, X., Yuan, Z., 2017. Nitric oxide mediates apoptosis and mitochondrial dysfunction and plays a role in growth hormone deficiency by nivalenol in GH3 cells. *Sci. Rep.* 7, 17079. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16908-y>
- Hussain Bhat, A., Dar, K.B., Anees, S., Zargar, M.A., Masood, A., Sofi, M.A., Ganie, S.A., 2015. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomed. Pharmacother.* 74, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.07.025>
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., Yamamoto, M., 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13, 76–86. <https://doi.org/10.1101/gad.13.1.76>
- Jeon, S.W., Kim, Y.-K., 2017. Inflammation-induced depression: Its

- pathophysiology and therapeutic implications. *J. Neuroimmunol.* 313, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.10.016>
- Kalonia, H., Mishra, J., Kumar, A., 2012. Targeting neuro-inflammatory cytokines and oxidative stress by minocycline attenuates quinolinic-acid-induced huntington's disease-like symptoms in rats. *Neurotox. Res.* 22, 310–320. <https://doi.org/10.1007/s12640-012-9315-x>
- Kaplan, J.H., 2002. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 511–535. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.102201.141218>
- Kaspar, J.W., Niture, S.K., Jaiswal, A.K., 2009. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.035>
- Kolling, J., Scherer, E.B.S., Siebert, C., Longoni, A., Loureiro, S., Weis, S., Petenuzzo, L., Wyse, A.T.S., 2016. Severe Hyperhomocysteinemia Decreases Respiratory Enzyme and Na⁺-K⁺ATPase Activities, and Leads to Mitochondrial Alterations in Rat Amygdala. *Neurotox. Res.* 29, 408–418. <https://doi.org/10.1007/s12640-015-9587-z>
- Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., Georgakilas, A.G., 2011. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat. Res.* 711, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.12.016>
- Li, Y., Park, J.S., Deng, J.H., Bai, Y., 2006. Cytochrome c oxidase subunit IV is essential for assembly and respiratory function of the enzyme complex. *J. Bioenerg. Biomembr.* 38, 283–291. <https://doi.org/10.1007/s10863-006-9052-z>
- Lin, M.T., Beal, M.F., 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787–795. <https://doi.org/10.1038/nature05292>
- Lopina, O.D., 2000. Na⁺,K⁺-ATPase: structure, mechanism, and regulation. *Membr. Cell Biol.* 13, 721–44.
- Lugo-Huitrón, R., Ugalde Muñiz, P., Pineda, B., Pedraza-Chaverrí, J., Ríos, C., Pérez-De La Cruz, V., 2013. Quinolinic acid: An endogenous neurotoxin with multiple targets. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/104024>
- Luis-García, E.R., Limón-Pacheco, J.H., Serrano-García, N., Hernández-Pérez, A.D., Pedraza-Chaverri, J., Orozco-Ibarra, M., 2017. Sulforaphane prevents quinolinic acid-induced mitochondrial dysfunction in rat striatum. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 31. <https://doi.org/10.1002/jbt.21837>
- Moroni, F., Cozzi, A., Sili, M., Mannaioni, G., 2012. Kynurenic acid: A metabolite with multiple actions and multiple targets in brain and periphery. *J. Neural Transm.* 119, 133–139. <https://doi.org/10.1007/s00702-011-0763-x>

- Moroni, F., Russi, P., Lombardi, G., Beni, M., Carlà, V., 1988. Presence of Kynurenic Acid in the Mammalian Brain. *J. Neurochem.* 51, 177–180. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1988.tb04852.x>
- Navarro, A., Boveris, A., 2007. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C670-86. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00213.2006>.
- Niture, S.K., Khatri, R., Jaiswal, A.K., 2014. Regulation of Nrf2 - An update. *Free Radic. Biol. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.008>
- Ogawa, H., Shinoda, T., Cornelius, F., Toyoshima, C., 2009. Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na⁺,K⁺-ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 13742–13747. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907054106>
- Ogawa, T., Matson, W.R., Beal, M.F., Myers, R.H., Bird, E.D., Milbury, P., Saso, S., 1992. Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease. *Neurology* 42, 1702–1706. <https://doi.org/10.1212/WNL.42.9.1702>
- Parrott, J.M., O'Connor, J.C., 2015. Kynurenine 3-monooxygenase: An influential mediator of neuropathology. *Front. Psychiatry* 6, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2015.00116>
- Pellicciari, R., Natalini, B., Costantino, G., Mahmoud, M.R., Mattoli, L., Sadeghpour, B.M., Moroni, F., Chiarugi, A., Carpenedo, R., 1994. Modulation of the Kynurenine Pathway in Search for New Neuroprotective Agents. Synthesis and Preliminary Evaluation of (m-Nitrobenzoyl)alanine, a Potent Inhibitor of Kynurenine-3-hydroxylase. *J. Med. Chem.* 37, 647–655. <https://doi.org/10.1021/jm00031a015>
- Pierozan, P., Biasibetti-Brendler, H., Schmitz, F., Ferreira, F., Pessoa-Pureur, R., Wyse, A.T.S., 2017. Kynurenic Acid Prevents Cytoskeletal Disorganization Induced by Quinolinic Acid in Mixed Cultures of Rat Striatum. *Mol. Neurobiol.* 1–14. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0749-2>
- Poeggeler, B., Rassoulpour, A., Guidetti, P., Wu, H.Q., Schwarcz, R., 1998. Dopaminergic control of kynurenate levels and N-methyl-D-aspartate toxicity in the developing rat striatum. *Dev. Neurosci.* 20, 146–153. <https://doi.org/10.1159/000017309>
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K., 2014. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *Biomed Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2014/761264>
- Sadeghnia, H.R., Kamkar, M., Assadpour, E., Boroushaki, M.T., Ghorbani, A., 2013. Protective effect of safranal, a constituent of crocus sativus, on quinolinic acid-induced oxidative damage in rat hippocampus. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 16, 73–82.
- Santamaría, A., Santamaría, D., Díaz-Muñoz, M., Espinoza-González, V., Ríos,

- C., 1997. Effects of N ω -nitro-L-arginine and L-arginine on quinolinic acid-induced lipid peroxidation. *Toxicol. Lett.* 93, 117–124. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(97\)00082-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(97)00082-9)
- Sas, K., Robotka, H., Toldi, J., Vécsei, L., 2007. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J. Neurol. Sci.* 257, 221–239. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.01.033>
- Savitz, J., Drevets, W.C., Wurfel, B.E., Ford, B.N., Bellgowan, P.S.F., Victor, T.A., Bodurka, J., Teague, T.K., Dantzer, R., 2015. Reduction of kynurenic acid to quinolinic acid ratio in both the depressed and remitted phases of major depressive disorder. *Brain. Behav. Immun.* 46, 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.02.007>
- Schmitz, F., Pierozan, P., Rodrigues, A.F., Biasibetti, H., Grings, M., Zanotto, B., Coelho, D.M., Vargas, C.R., Leinritz, G., Wyse, A.T.S., 2016. Methylphenidate Decreases ATP Levels and Impairs Glutamate Uptake and Na⁺,K⁺-ATPase Activity in Juvenile Rat Hippocampus. *Mol. Neurobiol.* 1–12. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0289-1>
- Schwarcz, R., Stone, T.W., 2017. The kynurenine pathway and the brain: Challenges, controversies and promises. *Neuropharmacology* 112, 237–247. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.003>
- Schweinberger, B.M., Schwieder, L., Scherer, E., Sitta, A., Vargas, C.R., Wyse, A.T.S., 2014. 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. *Metab. Brain Dis.* 29, 153–60. <https://doi.org/10.1007/s11011-013-9451-x>
- Sochocka, M., Koutsouraki, E.S., Gasiorowski, K., Leszek, J., 2013. Vascular oxidative stress and mitochondrial failure in the pathobiology of Alzheimer's disease: a new approach to therapy. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 12, 870–81.
- Speit, G., Hartmann, A., 2006. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol. Biol.* 314, 275–286. <https://doi.org/10.1385/1-59259-973-7:275>
- Stone, T.W., 1993. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol. Rev.* 45, 309–379.
- Stowe, D.F., Camara, A.K.S., 2009. Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 1373–1414. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2331>
- Suhail, M., 2010. Na⁺, K⁺-ATPase: Ubiquitous Multifunctional Transmembrane Protein and its Relevance to Various Pathophysiological Conditions. *J. Clin. Med. Res.* <https://doi.org/10.4021/jocmr2010.02.263w>

- Sun, N., Youle, R.J., Finkel, T., 2016. The Mitochondrial Basis of Aging. *Mol. Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.028>
- Tan, L., Yu, J.T., Tan, L., 2012. The kynurenine pathway in neurodegenerative diseases: Mechanistic and therapeutic considerations. *J. Neurol. Sci.* 323, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.08.005>
- Tasset, I., Pérez-De La Cruz, V., Elinos-Calderón, D., Carrillo-Mora, P., González-Herrera, I.G., Luna-López, A., Konigsberg, M., Pedraza-Chaverri, J., Maldonado, P.D., Ali, S.F., Túnez, I., Santamaría, A., 2010. Protective effect of tert-butylhydroquinone on the quinolinic-acid-induced toxicity in rat striatal slices: Role of the Nrf2-antioxidant response element pathway. *NeuroSignals* 18, 24–31. <https://doi.org/10.1159/000243650>
- Tavares, R.G., Schmidt, A.P., Tasca, C.I., Souza, D.O., 2008. Quinolinic acid-induced seizures stimulate glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain: Effects prevented by guanine-based purines. *Neurochem. Res.* 33, 97–102. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9421-y>
- Turski, W. a, Nakamura, M., Todd, W.P., Carpenter, B.K., Whetsell, W.O., Schwarcz, R., 1988. Identification and quantification of kynurenic acid in human brain tissue. *Brain Res.* 454, 164–9.
- Vitvitsky, V.M., Garg, S.K., Keep, R.F., Albin, R.L., Banerjee, R., 2012. Na⁺ and K⁺ ion imbalances in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1822, 1671–1681. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.07.004>
- Vuoristo, K.S., Mars, A.E., Sanders, J.P.M., Eggink, G., Weusthuis, R.A., 2016. Metabolic Engineering of TCA Cycle for Production of Chemicals. *Trends Biotechnol.* 34, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.11.002>
- Wang, X.Q., 2003. Apoptotic insults impair Na⁺, K⁺-ATPase activity as a mechanism of neuronal death mediated by concurrent ATP deficiency and oxidant stress. *J. Cell Sci.* 116, 2099–2110. <https://doi.org/10.1242/jcs.00420>
- Wilkins, H.M., Morris, J.K., 2017. New Therapeutics to Modulate Mitochondrial Function in Neurodegenerative Disorders. *Curr. Pharm. Des.* 23, 731–752. <https://doi.org/10.2174/1381612822666161230144517>
- Wyse, A.T.S., Noriler, M.E., Borges, L.F., Floriano, P.J., Silva, C.G., Wajner, M., Wannmacher, C.M.D., 1999. Alanine prevents the decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity in experimental phenylketonuria. *Metab. Brain Dis.* 14, 95–101. <https://doi.org/10.1023/A:1020705713548>
- Wyse, A.T.S., Zugno, A.I., Streck, E.L., Matté, C., Calcagnotto, T., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., 2002. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. *Neurochem. Res.* 27, 1685–1689. <https://doi.org/10.1023/A:1021647329937>
- Zádori, D., Klivényi, P., Szalárdy, L., Fülöp, F., Toldi, J., Vécsei, L., 2012.

Mitochondrial disturbances, excitotoxicity, neuroinflammation and kynurenines: Novel therapeutic strategies for neurodegenerative disorders. *J. Neurol. Sci.* 322, 187–191. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.06.004>

Zádori, D., Klivényi, P., Vámos, E., Fülöp, F., Toldi, J., Vécsei, L., 2009. Kynurenines in chronic neurodegenerative disorders: Future therapeutic strategies. *J. Neural Transm.* <https://doi.org/10.1007/s00702-009-0263-4>

8 ANEXOS

8.1 Anexo I - Carta de aprovação do comitê de ética



U F R G S
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: 31435

Título: Avaliação do efeito neuroprotetor do ácido quinurênico em ratos submetidos ao modelo da Doença da Huntington Juvenil

Vigência: 30/06/2016 à 30/06/2018

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ANGELA TEREZINHA DE SOUZA WYSE - coordenador desde 30/06/2016
FERNANDA SILVA FERREIRA - Aluno de Mestrado desde 30/06/2016

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 11/07/2016 - SALA 323 DO ANEXO I DO PRÉDIO DA REITORIA DA UFRGS/CAMPUS CENTRO/UFRGS, Comissão de Ética no Uso de Animais aprovou o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO ÁCIDO QUINURÊNICO EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DA DOENÇA DE HUNTINGTON JUVENIL", em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 180 ratos Wistar machos de 30 dias de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 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).

Porto Alegre, Sexta-Feira, 29 de Julho de 2016

MARCELO MELLER ALIEVI
Coordenador da comissão de ética