



UFSM
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA
TOXICOLÓGICA

COMPOSTOS 1,2 E 1,4-DICARBOXÍLICOS ATUAM SOBRE O
SISTEMA GLUTAMATÉRGICO E O COMPORTAMENTO DE RATOS E
CAMUNDONGOS

TESE DE DOUTORADO

Valéria Dornelles Gindri Senhorin

Santa Maria, RS, Brasil
2005

**COMPOSTOS 1,2 E 1,4-DICARBOXÍLICOS ATUAM SOBRE O
SISTEMA GLUTAMATÉRGICO E O COMPORTAMENTO DE RATOS E
CAMUNDONGOS**

por

Valéria Dornelles Gindri Senhorin

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, área de concentração Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Bioquímica Toxicológica.**

Orientador: Carlos Fernando de Mello

**Santa Maria, RS, BRASIL
2005**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica**

A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**COMPOSTOS 1,2 E 1,4-DICARBOXÍLICOS ATUAM SOBRE O
SISTEMA GLUTAMATÉRGICO E O COMPORTAMENTO DE RATOS E
CAMUNDONGOS**

elaborada por
Valéria Dornelles Gindri Senhorin

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Carlos Fernando de Mello, Dr.
(Presidente/Orientador)

Clóvis M.D. Wannmacher, Dr. (UFRGS)

Carla Dalmaz, Dr. (UFRGS)

Helio Gauze Bonacorso, Dr. (UFSM)

Rudi Weiblen, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 27 de julho de 2005.

*Dedico esta tese a
aqueles que me deram a vida,
“MEUS PAIS” e ao meu
esposo ADILSON. Meu
muito obrigada pelo carinho,
amor e paciência.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado o dom da vida e mostrar um mundo novo a cada dia. Ao Menino Jesus de Praga e a Nossa Senhora Aparecida pela força em todos os momentos difíceis da minha vida. Meu muito obrigada!

Aos pobres ratos e camundongos, que muito sofreram nas minhas mãos ao longo destes cinco anos, doaram suas vidas em benefício da ciência, o meu respeito!

Ao meu “marido Adilson”, pelo amor, dedicação, a não paciência “às vezes”, e pelo exemplo de que não importam as dificuldades quando realmente se quer crescer e vencer na vida.

Aos meus pais, Antônio e Elena, que sempre me deram força para eu seguir em frente. Ao meu irmão Marcelo pelo incentivo desde o início da minha vida acadêmica e, a minha irmã Luciane, por tudo que fez por mim nestes últimos tempos. Muito obrigada!

À minha querida cunhada Cláudia, que esteve sempre do outro lado da linha agüentando meus suspiros e queixas da vida, me dando força e que, para mim, um exemplo de superação.

Aos meus sogros, cunhados, concunhados e sobrinhos pelo carinho com que me acolheram.

À minha querida tia Neuza e a madrinha Ana, ambas já não vivem mais entre nós, o meu eterno carinho pela força e incentivo que me deram enquanto vivas. Tenho certeza que um dia nos encontraremos. Essa conquista também é dedicada a vocês!

Agradeço ao meu orientador, professor Carlos F. Mello, por permitir que eu fizesse parte do seu grupo, pelos conhecimentos passados, por não medir esforços em me ajudar. Por mostrar que se deve ter amor e dedicação pela profissão escolhida, e que o resto é lucro. Pelos momentos descontraídos e é claro, pelas “mijadas”, que do seu jeito, era para ensinar a coisa certa.

À minha co-orientadora Maribel A. Rubin, sempre alegre e disposta a me ajudar.

A todas as pessoas que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, especialmente a Cheila que me ensinou muitas coisas e uma grande companheira nos velhos tempos. E a Dinah que, mesmo tendo ficado tão pouco tempo no lab mostrou-se muito querida e dedicada.

E muito bem lembradas, a Flávia, a Lia, a Nádia, a Gerusa, a Aninha, todas sempre muito parceiras, muitas risadas, foi muito legal os momentos que passamos juntas. Vou sempre lembrar com carinho!

O “Bico de Luz” e “my dear friend” Alessandra. A parceira, a amiga de todas as horas. Nunca vou me esquecer dos nossos “Dialogues in English e as confeitarias de final de tarde“. E a Jú Saibt, nos tornamos amigas em função dos nossos casamentos. Muitas vezes cuidou de mim quando eu chegava na segunda-feira com aquela mochila pesada.

Quero agradecer também a todas as pessoas do laboratório pelo aprendizado e pelos momentos felizes. Aos que já saíram do laboratório pelos momentos bons que passamos juntos (Jú Fleck, Zuzu, Cláudia, Daia, Mari, Celoni, etc...). Aos novos que entraram recentemente (Carine, Sara, Camila, Carla, Ana Paula, etc...), pela alegria e descontração. Pena que vocês entraram tão tarde! A Kely, parceira nas horas de atividade física, sempre “tentando” manter a forma e também aliviar os estresses do dia.

A minha querida e quase irmã Patrícia Marisco e meu grande amigo Jédison. Vocês que se tornaram minha família em Cruz Alta. Milhares de momentos alegres, jantas quase que religiosamente nos finais de semana, passeios, etc. Muito obrigada por vocês fazerem parte da minha vida. Adoro vocês!

A minha amiga Eliza, sempre correndo contra o tempo, mas de alguma maneira dava um jeito de vir fazer uma visitinha. Obrigada pelo carinho!

Ah! A Natura, clientes e amigos que conquistei ao longo desses anos.

Aos demais professores do PPGBT, pelo conhecimento transmitido.

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de crescimento e aprendizado.

Agradeço a CAPES, pelo apoio financeiro.

Mas é claro que o sol
Vai voltar amanhã
Mais uma vez, eu sei
Escuridão já vi pior
De endoidecer gente sã
Espera que o sol já vem
Tem gente que está do mesmo lado que você
Mas deveria estar do lado de lá
Tem gente que machuca os outros
Tem gente que não sabe amar
Tem gente enganando a gente
Veja nossa vida como está
Mas eu sei que um dia a gente aprende
Se você quiser alguém em quem confiar
Confie em si mesmo
Quem acredita sempre alcança
Mas é claro que o sol...
Nunca deixe que lhe digam
Que não vale a pena Acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém
Tem gente que machuca os outros
Tem gente que não sabe amar
Mas eu sei que um dia a gente aprende...

Renato Russo

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
APRESENTAÇÃO.....	xvii
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	02
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	06
2.1. GLUTAMATO.....	07
2.2. RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS.....	09
2.2.1. RECEPTORES NMDA.....	09
2.2.2. RECEPTORES AMPA E KA.....	11
2.2.3. RECEPTORES METABOTRÓPICOS.....	12
2.3. A IMPORTÂNCIA DOS COMPOSTOS DICARBOXÍLICOS.....	14
2.3.1. COMPOSTOS DE CADEIA CÍCLICA E ESTRUTURA RÍGIDA.....	14
2.3.2. COMPOSTOS DE CADEIA ACÍCLICA E ESTRUTURA FLEXÍVEL.....	19
2.4. FORMAÇÃO DAS ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO (EAO)..	23
2.4.1. REATIVIDADE DAS EAO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS.....	25
2.4.2. LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO).....	25

2.4.3. OXIDAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	27
2.4.4. SISTEMAS DE DEFESAS ANTIOXIDANTES CONTRA AS EAO.....	27
2.4.5. AS EAO E O SNC.....	28
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	29
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
ARTIGO 1 – Sinhorin, V.D.G.; Carpes, M.J.S.; Roerhs, C.; Zimmer, M.F.; Sauzem, P.D.; Rubin, M.A.; Correia, C.R.D.; Mello, C.F. D,L- <i>cis</i> - 2,3-Pyrrolidine dicarboxylate alters [³ H]-L-glutamate binding and induces convulsions in mice. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 76: 295-299, 2003.....	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
ARTIGO 2 - Sinhorin, V.D.G.; Roerhs, C.; Pasin J.S.M.; Bellé, N.A.V.; Rubin, M.A.; Mello, C.F. Succinate causes oxidative damage through N-methyl-D-aspartate-mediated mechanisms. Brain Research, xx: xxx-xxx, 2005.....	37
4. DISCUSSÃO.....	44
5. CONCLUSÃO.....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
(2R,4R)-APDC	Ácido (2R,4R)-4-aminopirrolidina-2,4-dicarboxílico
μ l	Microlitro
μ M	Micromolar
μ mol	Micromol
[³ H]-KA	Ácido Caínico radioativo (marcado com trítio)
[³ H]-MK-801	Dizocilpina radioativo (marcado com trítio)
>C=O	Grupo carbonil
2,3-PDCs	2,3-dicarboxilatos de pirrolidina
2-AA	Ácido 2-amino adípico
AAE	Aminoácido excitatório
ABHx-I	Ácido (1S,2S,4S,5S)-2-aminobiciclo[2.1.1]hexano-2,5-dicarboxílico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AP-5	Ácido D-2-amino-5-fosfonopentanóico
ATP	Adenosina trifosfato
C3	Carbono 3
C4	Carbono 4
CA1	Região 1 do Corno de Ammon
Ca ²⁺	Íon cálcio
CA3	Região 3 do Corno de Ammon
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
CuZnSOD	Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNQX	6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona
EAA-T	Transportador de aminoácido excitatório
EAO	Espécies ativas de oxigênio
FCS	Fluido cérebro espinhal
H ⁺ -ATPase	Enzima ATPase dependente de próton

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HO•	Radical hidroxil
ICV	Intracerebroventricular
iGLURs	Receptores glutamatérgicos ionotrópicos
IPs	Fosfatos de inositol
K ⁺	Íon potássio
KA	Cainato
KD	Kilodaltons
Kd	Constante de dissociação
Ki	Constante de inibição
[³ H]-L-glutamato	L-glutamato radioativo (marcado com trítio)
L- <i>anti-endo</i> -MPDC	Ácido L- <i>anti-endo</i> -3,4-metanopirrolidina-3,4-dicarboxílico
L-AP4	Ácido L-2-amino-4-fosfonobutanóico
L-CCG-I	(2S,3S,4S)-2-carboxiciclopropilglicina
L-CCG-IV	(2S,3R,4S)-2-carboxiciclopropilglicina
D,L- <i>cis</i> -2,3-PDC	D,L- <i>cis</i> -2,3-dicarboxilato de pirrolidina
LPO	Liperoxidação
LTP	Potencialização de longa duração
L- <i>trans</i> -2,3-PDC	L- <i>trans</i> -2,3-dicarboxilato de pirrolidina
L- <i>trans</i> -2,4-PDC	L- <i>trans</i> -2,4-dicarboxilato de pirrolidina
LY354740	Ácido (1S,2S,5R,6S)-2-aminobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico
MDA	Malondialdeído
Mg ²⁺	Íon magnésio
mGLURs	Receptores glutamatérgicos metabotrópicos
MK-801	Dizocilpina
mM	Milimolar
mmol	Milimol
MnSOD	Superóxido dismutase dependente de manganês
N1	Nitrogênio na posição 1
Na ⁺	Íon sódio
NaCl	Cloreto de sódio (salina)
NBQX	6-nitro-7-sulfamoilbenzoquinolina-2,3-diona

nM	Nanomolar
NMDA	N-metil-D-aspartato
nmol	Nanomol
NOS	Óxido nítrico sintase
NR	Receptor glutamatérgico ionotrópico do tipo NMDA
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
PCP	Fenciclidina
PEPSs	Potenciais pós-sinápticos excitatórios de campo
PPDA	Ácido 1-(fenantreno-2-carbonil)-piperazina-2,3-dicarboxílico
RL	Radical livre
ROO [•]	Radical peroxil
SDH	Sucinato desidrogenase
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias que reagem ao Ácido Tiobarbitúrico
TBOA	D,L- treo-β-benziloxiaspartato
THA	Treo-β-hidroxiaspartato
<i>trans</i> -ACPD	Ácido (1SR,3RS)-1-aminociclopentano-1,3-dicarboxílico
V-ATPase	ATPases vacuolares
Zn ²⁺	Íon zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmulas estruturais dos compostos dicarboxílicos análogos do L-glutamato.....	04
Figura 2 - Transmissão sináptica nervosa.....	09
Figura 3 - Representação esquemática do receptor NMDA.....	10
Figura 4 - Ações do glutamato na fenda sináptica sobre os receptores glutamatérgicos.....	13
Figura 5 - Configuração eletrônica das Espécies Ativas de oxigênio (EAO).....	23
Figura 6 - Reação colorimétrica do TBA com MDA.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alguns compostos dicarboxílicos de cadeia cíclica e estrutura rígida.....	17
Tabela 2 - Compostos dicarboxílicos de cadeia acíclica e estrutura flexível.....	21

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

**COMPOSTOS 1,2 E 1,4-DICARBOXÍLICOS ATUAM SOBRE O SISTEMA
GLUTAMATÉRGICO E O COMPORTAMENTO DE RATOS E CAMUNDONGOS**

Autora: Valéria Dornelles Gindri Senhorin

Orientador: Carlos Fernando de Mello

Data e local da defesa: Santa Maria, 27 de julho de 2005.

Os receptores glutamatérgicos são alvos da ação de muitas neurotoxinas análogas ao L-glutamato. Neste estudo foram investigadas as ações de dois compostos dicarboxílicos, um de cadeia cíclica e estrutura rígida e o outro de cadeia acíclica e estrutura flexível, sobre a neurotransmissão glutamatérgica, dano oxidativo e comportamento em roedores. No primeiro trabalho foi investigado se o D,L-*cis*-2,3-dicarboxilato de pirrolidina (D,L-*cis*-2,3-PDC) altera a ligação de [³H]-L-glutamato em membranas plasmáticas de córtex de ratos adultos e se os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) estão envolvidos nas convulsões induzidas por este composto. O D,L-*cis*-2,3-PDC reduziu a ligação de [³H]-L-glutamato Na⁺-independente em 50% nas preparações de membranas rompidas e não apresentou efeito sobre a ligação de [³H]-L-glutamato Na⁺-dependente. A administração intracerebroventricular (ICV) de D,L-*cis*-2,3-PDC (7,5; 25 nmol/ 5 µl) induziu convulsões generalizadas do tipo tônico-clônica nos camundongos, de uma maneira dose-dependente. A co-administração de MK-801 (7 nmol/ 2,5 µl; ICV), um antagonista não-competitivo dos receptores NMDA, com D,L-*cis*-2,3-PDC (16,5 nmol/ 2,5 µl; ICV), protegeu totalmente os animais das convulsões induzidas por D,L-*cis*-2,3-PDC, enquanto que a co-administração de DNQX (10 nmol/ 2,5 µl; ICV), um antagonista dos receptores AMPA e KA, aumentou a latência das convulsões, mas não alterou a percentagem de animais que tiveram convulsões. Estes resultados sugerem que os efeitos induzidos por D,L-*cis*-2,3-PDC são mediados principalmente pela ativação dos receptores NMDA. No segundo estudo, foi investigado se o succinato, substrato que se acumula nas deficiências da enzima succinato desidrogenase (SDH) e nas intoxicações por inibidores da SDH, causa lipoperoxidação e carbonilação protéica, e se os receptores NMDA estão envolvidos no dano oxidativo induzido por succinato. Camundongos machos adultos receberam uma injeção ICV de succinato (0,7; 1,0; 1,7 µmol/ 5 µl) ou 0,9 % de NaCl (5 µl) e seu comportamento foi analisado em um campo aberto por 10 minutos. Succinato (0,7; 1,0 µmol/ 5 µl) diminuiu a atividade locomotora e aumentou as substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e carbonilação protéica no cérebro. Por outro lado, 1,7 µmol de succinato não alterou a atividade locomotora ou os parâmetros de dano oxidativo. O envolvimento dos receptores NMDA no aumento induzido por succinato do conteúdo de carbonilação protéica e da inibição do comportamento exploratório foi avaliado pela co-administração de MK-801 (7nmol/ 2,5 µl, ICV) com succinato (1 µmol/ 2,5 µl, ICV). A co-administração de MK801 protegeu contra o aumento induzido por succinato da carbonilação protéica e na diminuição da atividade locomotora. Esses resultados sugerem o envolvimento dos receptores NMDA nesses efeitos do succinato, os quais são de grande relevância nas condições em que acumula succinato, tais como as intoxicações com inibidores da SDH e deficiências dessa enzima causadas por erros inatos do metabolismo.

Palavras-chave: MK-801; convulsão; glutamato; DNQX; receptores NMDA; espécies ativas de oxigênio.

ABSTRACT

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

**1,2 AND 1,4-DICARBOXYLIC COMPOUNDS ACTUATE ON THE
GLUTAMATERGIC SYSTEM AND THE BEHAVIOR OF RATS AND MICE**

Author: Valéria Dornelles Gindri Sinhörin
Advisor: Carlos Fernando de Mello
Date and place: Santa Maria, July 27th, 2005.

Glutamatergic receptors are targets for many L-glutamate structure analogues, which cause neurotoxicity. This study investigated the actions of two dicarboxylic compounds, the first had cyclic framework and rigid structure, and the other had an acyclic framework and flexible structure, on the glutamatergic neurotransmission, oxidative damage and behavior in mice. The first compound evaluated was D,L-*cis*-2,3-pyrrolidine dicarboxylate (D,L-*cis*-2,3-PDC), a new glutamate analogue. D,L-*cis*-2,3-PDC reduced sodium-independent [³H]-L-glutamate binding by 50% in lysed membrane preparations and had no effect on sodium-dependent glutamate binding. Intracerebroventricular administration (ICV) of D,L-*cis*-2,3-PDC (7.5 - 25 nmol/ 5 μ l) induced dose-dependent tonic-clonic convulsions. The co-administration of MK-801 (7 nmol/ 2.5 μ l; ICV), a noncompetitive NMDA receptor antagonist, with D,L-*cis*-2,3-PDC (16.5 nmol/ 2.5 μ l; ICV) fully protected the animals against D,L-*cis*-2,3-PDC-induced convulsions, while the co-administration of DNQX (10 nmol/ 2.5 μ l; ICV), a AMPA and KA receptors antagonist, increased the latency to convulsion and did not alter the percentage of animals that had convulsions. These results suggest that D,L-*cis*-2,3-PDC-induced effects are mediated predominantly by NMDA receptors activation. The second compound studied was succinate, the accumulating substrate in succinate dehydrogenase (SDH) deficiencies and SDH inhibitor intoxication. Adult male mice received an ICV injection of succinate (0.7, 1.0 and 1.7 μ mol/ 5 μ l) or 0.9% NaCl (5 μ l) and had their exploratory behavior assessed in an open field for 10 min. Succinate (0.7 and 1.0 μ mol/ 5 μ l) decreased locomotor activity behavior and increased thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonylation in the forebrain. Conversely, 1.7 μ mol of succinate did not alter locomotor activity or oxidative damage parameters. The involvement of NMDA receptors in the succinate-induced increase of total protein carbonylation content and exploratory behavior inhibition was assessed by co-administering MK-801 (7 nmol/ 2.5 μ l, ICV) with succinate (1 μ mol/ 2.5 μ l, ICV). The co-administration of MK-801 protected against succinate-induced increase of total protein carbonylation and decrease of locomotor activity. These results suggest the involvement of NMDA receptors in these effects of succinate, which may of particular relevance for succinate-accumulating conditions, such as SDH inhibitors intoxication and inherited SDH deficiencies.

Keywords: MK-801; convulsion; glutamate; DNQX; NMDA receptors; oxygen reactive species

1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O composto dicarboxílico L-glutamato é o aminoácido livre mais abundante no sistema nervoso central (SNC). A maior parte do L-glutamato presente no tecido nervoso (70%) apresenta funções metabólicas (participa da biossíntese de proteínas, entre outras) idênticas às exercidas por este aminoácido nos outros tecidos (Dingledine & McBain, 1994). Além dessas funções, o L-glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC de mamíferos, tendo importante papel em alterações plásticas associadas às funções de aprendizagem e memória, regulação neuroendócrina, assim como em algumas doenças neurodegenerativas, tais como doença de Huntington, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, epilepsia e na formação de redes neurais durante o desenvolvimento (Nakanishi, 1992; McEntee & Crook, 1993; Lipton & Rosenberg, 1994; Brann, 1995).

A neurotransmissão glutamatérgica é mediada por duas classes distintas de receptores: (a) ionotrópicos (ligados a canais iônicos, de cálcio e sódio), tais como, N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA) e Cainato (KA) (Watkins & Evans, 1981; Dingledine et al., 1988; Coyle & Puttfarcken, 1993); e (b) metabotrópicos (acoplados a proteína G e formação de segundos mensageiros) (Tanabe et al., 1992; Pin & Duvoisin, 1995).

Apesar da neurotransmissão glutamatérgica ser essencial em diversos processos fisiológicos, sabe-se que uma ativação excessiva do sistema glutamatérgico pode provocar dano e/ou morte neuronal (Olney, 1978; Lipton & Rosenberg, 1994; Price, 1999). Esta neurotoxicidade mediada por L-glutamato é freqüentemente denominada de excitotoxicidade (Olney, 1978), na qual a estimulação excessiva de receptores do subtipo NMDA desempenha papel importante. Quando o receptor NMDA é ativado, ocorre um influxo excessivo de Ca^{2+} (Choi, 1992) que pode provocar um aumento na produção de radicais livres e, conseqüentemente, lipoperoxidação, disfunções mitocondriais e diminuição na produção de energia. (Coyle & Puttfarcken, 1993; Dugan et al., 1995; Gunter et al., 1994).

O L-glutamato e o L-aspartato têm livre rotação espacial por serem moléculas acíclicas e terem estruturas flexíveis. Então, de acordo com a sua conformação, eles podem se ligar fisiologicamente tanto em receptores como em transportadores (Watkins et al., 1990; Ortwine et al., 1992; Chamberlin & Bridges, 1993). Existem na

literatura muitos estudos com compostos dicarboxílicos, análogos ao L-glutamato de cadeia cíclica e estrutura rígida, com o objetivo de melhor caracterizar e identificar os receptores glutamatérgicos. Estes análogos têm uma estrutura rígida e não mudam sua conformação, apresentando uma melhor seletividade de ligação nos receptores ou transportadores que o L-glutamato. Assim, são valiosos para caracterizar as propriedades de receptor/canal, mostrar a ativação de receptores visando os processos intracelulares, bem como estudar a sinalização sináptica e patologias excitotóxicas (Willis et al., 1997), como o L-*trans*-2,3-dicarboxilato de pirrolidina (L-*trans*-2,3-PDC) que apresenta uma estrutura rígida, e possui efeito neurotóxico em culturas corticais de cérebro de ratos semelhante ao NMDA, que é revertido pela coadição de MK-801, um antagonista não-competitivo dos receptores NMDA, (Willis et al., 1996). Nestes compostos 2,3-dicarboxilatos de pirrolidina (2,3-PDCs), as carboxilas estão uma ligação de carbono mais próximos, os quais exibem uma conformação estendida comparável ao aspartato ou uma conformação flexível do L-glutamato (Humphrey et al., 1994).

O succinato (ácido succínico), substrato da enzima succinato desidrogenase (SDH, EC 1.3.99.1; enzima que faz parte do Ciclo de Krebs e do complexo II da Cadeia Respiratória), é um ácido dicarboxílico de cadeia acíclica e estrutura flexível, análogo do L-glutamato (Danbolt, 2001) que apresenta semelhança estrutural ao NMDA. Este ácido dicarboxílico, quando administrado intracerebroventricularmente, em baixas concentrações, causa convulsão e letalidade que são prevenidos pela coadministração de MK-801 (Roehrs et al., 2004). Por outro lado, a administração intraestriatal de altas concentrações de succinato tem sido utilizada para prevenir a inibição metabólica, que leva a depleção de ATP, causada pelos inibidores reversíveis da SDH, como o malonato e metilmalonato, que se acumulam nos chamados erros inatos do metabolismo: acidemias malônica e metilmalônica, respectivamente, (Ozand et al., 1994; Erecinska & Nelson, 1994; Mello et al., 1996; Figuera et al., 1999; Okun et al., 2002). Deste modo, o succinato antagoniza os efeitos neurotóxicos daqueles compostos (Wajner et al., 1992; Greene & Greenamyre, 1995; Mello et al., 1996; Beal, 2000). Embora nos erros inatos ocorra o acúmulo de outros metabólitos reconhecidamente neurotóxicos, como a amônia na acidemia metilmalônica, pouco se sabe sobre o papel dos metabólitos secundários

que acumulam nestas patologias, como o próprio succinato (Erecinska & Nelson, 1994; Mello et al., 1996; Wajner & Coelho, 1997).

Portanto, os objetivos gerais do presente estudo foram investigar se o D,L-*cis*-2,3-PDC, um composto dicarboxílico de cadeia cíclica, estrutura rígida e diastereoisômero do L-*trans*-2,3-PDC, altera a neurotransmissão glutamatérgica e que receptores estão envolvidos na ação deste composto e, se o succinato, um composto de cadeia acíclica e estrutura flexível, causa dano oxidativo e se os receptores NMDA estão envolvidos neste dano, já que Roehrs et al. (2004) demonstraram que o succinato é excitotóxico em baixas concentrações via ativação dos receptores NMDA.

Para um melhor entendimento a figura 1 mostra as fórmulas estruturais do L-glutamato e seus análogos.

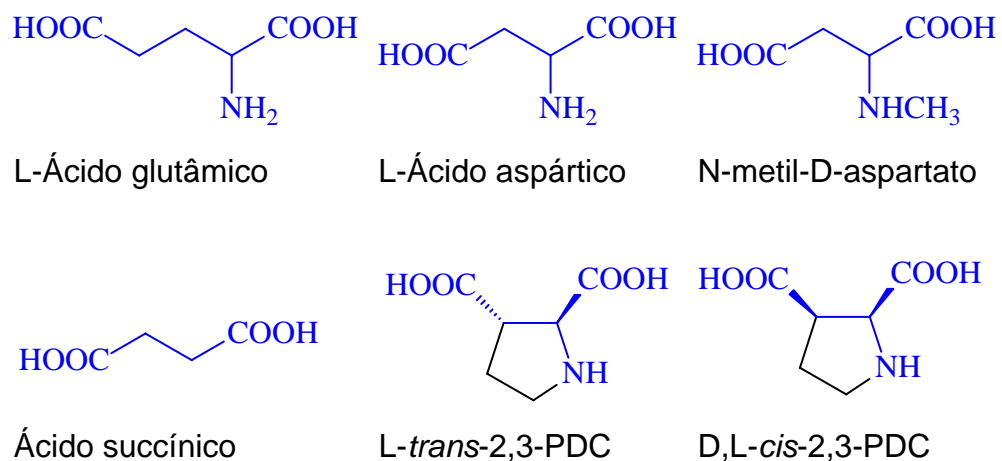


FIGURA 1: Fórmulas estruturais dos compostos dicarboxílicos análogos do L-glutamato.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

Nesta revisão da literatura, inicialmente faz-se um breve histórico sobre a origem do L-glutamato; suas ações como um neurotransmissor e os receptores envolvidos na neurotransmissão glutamatérgica. Após será feita uma revisão sobre alguns compostos dicarboxílicos, de cadeia cíclica e estrutura rígida e de cadeia acíclica com estrutura flexível, que apresentam analogia ao L-glutamato e atuam no sistema glutamatérgico. Para finalizar, será realizada uma revisão sobre as espécies ativas de oxigênio e sua relação com o SNC.

2.1 L-GLUTAMATO

Em 1935, Hans Krebs descobriu que o L-glutamato, um aminoácido dicarboxílico, apresentava um papel metabólico no cérebro. Posteriormente, Stern et al. (1949) demonstraram que o tecido cerebral tinha uma alta capacidade de captar o L-glutamato. A ação excitatória desse aminoácido proteinogênico no tecido cerebral foi descoberta em 1954 (Hayashi, 1954; Curtis et al., 1959; 1960), mas foi somente a partir da década de 80 se pôde confirmar que o L-glutamato, além de seus múltiplos papéis metabólicos, é o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos (Johnston, 1981; Roberts et al., 1981; Schousboe, 1981; Watkins & Evans, 1981; Fonnun, 1984).

A maioria das sinapses excitatórias do SNC têm o L-glutamato e, em menor proporção, o L-aspartato (Schoepp & Conn, 1993; Nakanishi & Masu, 1994; Brann, 1995; Cotman et al., 1995; Pin & Duvoisin, 1995) como neurotransmissor. Em função desta particularidade, estes aminoácidos são denominados aminoácidos excitatórios (AAE).

O L-glutamato está envolvido em uma grande variedade de processos fisiológicos, tais como reprodução, memória, doenças neurodegenerativas como esclerose lateral amiotrófica e em processos agudos como convulsões (Nakanishi, 1992; McEntee & Crook, 1993; Greenamyre & Porter, 1994; Lipton & Rosenberg, 1994; Ozawa et al., 1998). O L-glutamato também tem um papel sinalizador em órgãos periféricos e tecidos, bem como em células endócrinas (Moriyama et al., 2000).

O cérebro contém quantidades elevadas de L-glutamato (5-15 mmol/ kg de peso dependendo da região) (Schousboe, 1981), mas somente uma pequena quantidade está presente no líquido extracelular, ou entre as células. A concentração no fluido extracelular (o qual representa 13-22% do volume do tecido cerebral) e no fluido cerebrospinal (FCS) é normalmente 3-4 μM e 10 μM , respectivamente (Hamberger et al., 1983; Lehmann et al., 1983; Hamberger & Nyström, 1984). Conseqüentemente, a concentração de L-glutamato através das membranas plasmáticas, ou seja, dentro dos terminais nervosos, é muitas vezes maior do que no meio externo (Ottersen et al., 1992; Storm-Mathisen et al., 1992; Ottersen et al., 1996).

O L-glutamato é sintetizado nesses terminais a partir de: a) outros aminoácidos, por transaminação; b) oxaloacetato ou alfa-cetoglutarato produzidos

no ciclo de Krebs a partir da oxidação da glicose; c) glutamina, que é sintetizada nas células gliais, transportada para os terminais nervosos e neste local convertida em L-glutamato pela enzima glutaminase (Scatton, 1993); d) outras vias menos importantes, a partir da ornitina e prolina (Fonnun, 1984). Até o momento não há evidências de que alguma dessas vias seja específica para o “pool” neurotransmissor deste aminoácido. A compartimentalização entre os “pools” metabólico e neurotransmissor é obtida pela captação e armazenagem de L-glutamato em vesículas sinápticas, para posterior liberação na fenda sináptica quando o terminal pré-sináptico for despolarizado.

A captação vesicular do L-glutamato citosólico é mediada por um carreador de baixa afinidade presente na membrana das vesículas sinápticas (Fykse & Fonnun, 1996). A energia para o transporte é fornecida por um gradiente eletroquímico, formado através da membrana pela ação de uma H⁺-ATPase dependente de Mg²⁺, que pertence à classe das ATPases vacuolares (V-ATPase) (Fykse & Fonnun, 1996).

A liberação de L-glutamato das vesículas sinápticas é provocada por um potencial de ação que leva à despolarização da membrana pré-sináptica e a um influxo de íons Ca²⁺ através de canais sensíveis a voltagem (Nicholls, 1993). O aumento da concentração citosólica de Ca²⁺ promove a fusão das vesículas sinápticas com a membrana pré-sináptica liberando o seu conteúdo na fenda sináptica por exocitose de uma maneira Ca²⁺-dependente. Uma vez liberado, o L-glutamato exerce suas ações fisiológicas ativando receptores, que estão localizados nas membranas pré- e pós-sinápticas e na membrana das células gliais (figura 2).

A ação do neurotransmissor do L-glutamato na fenda sináptica é finalizada pela recaptação do aminoácido pela glia e neurônios. Nas células gliais, a glutamina sintetase converte L-glutamato em glutamina, que é, então, transportada para os terminais nervosos vizinhos, onde serve como precursora para o L-glutamato (Scatton, 1993).

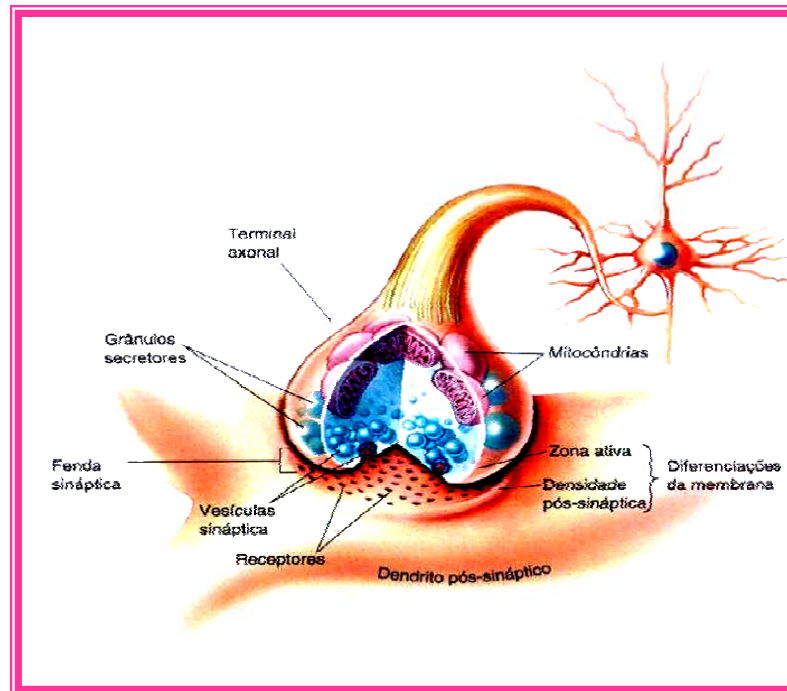


FIGURA 2: Transmissão sináptica nervosa. Adaptado de Bear et al. (2002).

2.2 RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS

A neurotransmissão glutamatérgica ocorre pela interação do L-glutamato com duas categorias distintas de receptores: ionotrópicos e metabotrópicos, que são classificados de acordo com suas propriedades farmacológicas e funcionais (Ozawa et al., 1998). Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos (iGLURs) são canais iônicos que permeiam cátions, através da membrana neuronal e que, quando ativados, induzem uma despolarização da membrana sináptica e conseqüente resposta excitatória.

Os iGLURs são subdivididos segundo sua sensibilidade a agonistas e antagonistas específicos em NMDA e não-NMDA, como o AMPA e KA (Ozawa et al., 1998).

2.2.1 RECEPTORES NMDA

O receptor NMDA é um complexo formado pelo receptor e um canal associado, e foi assim chamado devido à sua ativação pelo agonista NMDA. A sua atividade é regulada por uma série de reguladores alostéricos (Cotman et al., 1995) tanto endógenos quanto exógenos, os quais se ligam em sítios específicos

associados a este receptor. Dentre estes, existem sítios de ligação para agonistas como L-glutamato/NMDA e para antagonistas, um sítio para a união de bloqueadores (MK-801, PCP) no interior do canal, sítio onde se liga o Mg^{2+} (produzindo bloqueio voltagem-dependente do canal), sítio para o co-agonista endógeno glicina (insensível à estricnina), sítios modulatórios para o Zn^{2+} , para poliaminas, para prótons e um sítio sensível à modulação redox (modulado por agentes redutores e oxidantes) (Foster & Wong, 1987; Ransom & Stec, 1988; Singh et al., 1990; Willians et al., 1991; Piggott et al., 1992; Euler & Liu, 1993; Martin et al., 1995; Sucher et al., 1996; Ozawa et al., 1998) (figura 3).

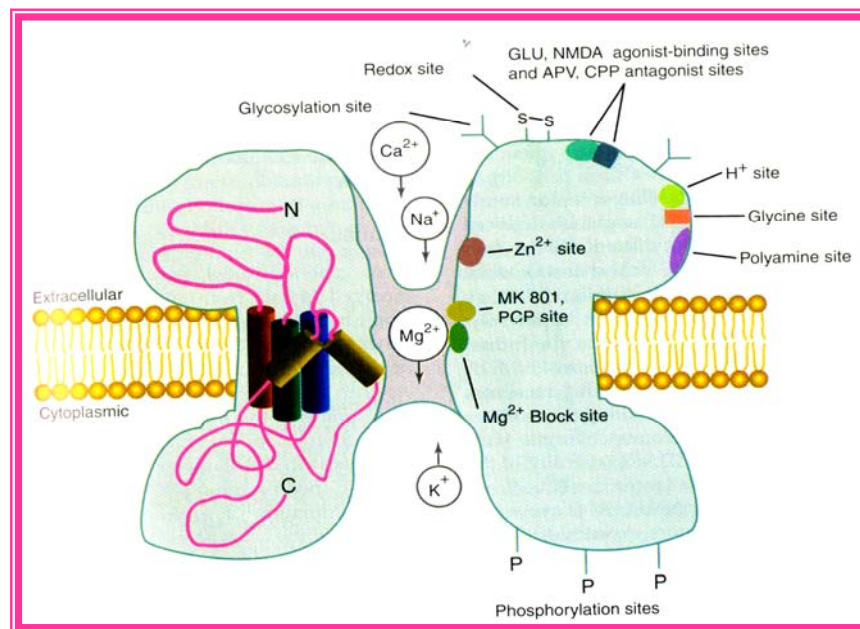


FIGURA 3: Representação esquemática do receptor NMDA. Adaptado de Zigmond et al. (1999).

O complexo do receptor NMDA é uma estrutura pentamérica e consiste de várias subunidades denominadas NR_1 (onde se liga a glicina), NR_2 (A-D) (onde se liga o L-glutamato) e NR_3 (A-B), sendo que suas massas moleculares variam de 33 a 67 kD (Mayer et al., 1992; Yamakura & Shimoji, 1999; Prybylowski & Wenthold, 2004).

O receptor NMDA medeia transmissão sináptica excitatória lenta, e a sua ativação resulta no influxo de Ca^{2+} e Na^+ , bem como o efluxo de K^+ , gerando uma despolarização da membrana (Scatton et al., 1993; Ozawa et al., 1998). Durante o potencial de repouso, o receptor NMDA apresenta seu canal bloqueado pelo íon

Mg²⁺ (Riedel et al., 2003), causando o impedimento da passagem de outros íons através do canal. Para que o receptor NMDA seja ativado é necessário que haja uma despolarização prévia da membrana, geralmente desencadeada pela ativação do receptor glutamatérgico AMPA. Sendo assim, o Mg²⁺ sai do poro somente quando a membrana está despolarizada. Este bloqueio voltagem-dependente do canal por Mg²⁺ pode ser visto como um mecanismo protetor intrínseco contra a entrada excessiva de íons Ca²⁺ na célula e subsequente toxicidade neuronal (Scatton et al., 1991).

A ativação do receptor NMDA contribui para a indução da potencialização de longa duração (LTP) e para fenômenos eletrofisiológicos associados à plasticidade neuronal (Bliss & Collingridge, 1993; Izquierdo & Medina, 1995). Além disso, vários estudos mostraram que os receptores NMDA estão envolvidos na morte celular observadas em doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e esclerose lateral amiotrófica (Scatton et al., 1993; Nicoletti et al., 1996; Beal, 1996, 2000).

Os receptores NMDA se encontram bem distribuídos pelo SNC de mamíferos, como nas camadas superficiais do córtex cerebral, hipocampo (regiões CA1 e giro denteado), estriado, septo, tálamo, células granulares do cerebelo e medula espinhal (Scatton et al., 1993).

2.2.2 RECEPTORES AMPA E KA

Os receptores AMPA e KA são mediadores primários de neurotransmissão excitatória rápida. A maioria destes receptores é permeável somente a íons Na⁺, mas alguns receptores AMPA exibem altas condutâncias aos íons Ca²⁺ (Brorson et al., 1992; Burnashev et al., 1992). Os receptores AMPA são complexos heteroméricos constituídos de várias subunidades iGLUR₁-iGLUR₄ (iGLUR_A-iGLUR_D). A subunidade iGLUR₂ no complexo do receptor AMPA torna este impermeável aos íons Ca²⁺ (Hollman & Heinemann, 1994).

Os receptores AMPA apresentam pelo menos três sítios de ligação: um sítio para o L-glutamato/AMPA, um sítio de união que modula a dessensibilização do receptor e outro que bloqueia o influxo de íons e está localizado no interior do canal (Ozawa et al., 1998). O KA é capaz de ativar os receptores AMPA e, por isso é

freqüentemente usado como um agonista destes receptores. Em contraste com o AMPA, o KA não dessensibiliza os receptores AMPA (Brauner-Osborne et al., 2000).

Os receptores KA são constituídos por duas famílias de subunidades (iGLUR₅-iGLUR₇, KA₁ e KA₂), das quais iGLUR₅-iGLUR₇ formam canais iônicos homoméricos. Estes canais são ativados por KA, porém com baixa afinidade, e muito pouco por AMPA. Por outro lado, KA₁ e KA₂ não formam canais homoméricos e apresentam alta afinidade pelo KA (Lomeli et al., 1992; Bettler et al., 1992). A atividade dos receptores KA pode ser distinguida dos receptores AMPA pela dessensibilização ao KA e a lenta recuperação do estado dessensibilizado (Brauner-Osborne et al., 2000).

Estudos de ligação com [³H]-KA sugerem que existe um número substancial de receptores KA nos terminais pré-sinápticos (Chittajallu et al., 1999). A ativação de receptores KA pré-sinápticos parecem reduzir a liberação de [³H]-L-glutamato em sinaptossomas de hipocampo (Chittajallu et al., 1996) e em sinapses excitatórias na região CA3 do hipocampo quando a subunidade iGLUR₅ está ativada (Vignes et al., 1998).

Como a distribuição anatômica, farmacológica e fisiológica das subunidades individuais é distinta, acredita-se que existem muitos receptores AMPA e KA endógenos considerados como um receptor único. Os derivados da quinoxalina 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona (DNQX); 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX) e o 6-nitro-7-sulfamoilbenzoquinoxalina-2,3-diona (NBQX) são antagonistas competitivos dos receptores AMPA e KA, sendo NBQX mais potente e específico para os receptores AMPA (Sheardown et al., 1990).

2.2.3 RECEPTORES METABOTRÓPICOS

Os receptores metabotrópicos são uma classe heterogênea de receptores de AAE acopladas a proteína-G (mGLUR_S) que apresentam funções importantes nos processos de sinalização neuronal (Conn & Patel, 1994; Moroni et al., 1998). Juntamente com os iGLURs, apresentam papéis importantes tanto na função normal quanto em alterações do SNC, sendo todos os subtipos destes receptores alvos potenciais na intervenção terapêutica de numerosas doenças. Dependendo do tipo de célula e subtipo de receptor, os receptores metabotrópicos podem estar ligados a alterações nos níveis de fosfatidil-inositol, metabolismo do ácido araquidônico ou

AMPC (Tanabe et al., 1992; Pin & Duvoisin, 1995). Até o presente momento, foram clonados oito subunidades dos mGLURs, designadas por mGLUR₁-mGLUR₈, todas com distribuições anatômicas diferentes (Tanabe et al., 1992; Saugstad et al., 1994; Pin & Duvoisin, 1995). Nakanishi (1992) propôs que os mGLURs poderiam ser classificados em três diferentes grupos baseados na identidade da seqüência de aminoácidos (em torno de 70% de homologia nos receptores do mesmo grupo e 40% entre os grupos). O grupo I é constituído das subunidades mGLUR₁ e mGLUR₅, são potencialmente ativados por quisqualato e estimulam a fosfolipase-C, causando um aumento intracelular de fosfatos de inositol (IPs) e Ca²⁺. O grupo II consiste de mGLUR₂ e mGLUR₃ e são ativados por (2S,3S,4S)-2-carboxiciclopropilglicina (L-CCG-I). O grupo III inclui a subunidades mGLUR₄, mGLUR₆, mGLUR₇, mGLUR₈ e são ativados por L-AP4. Os grupos II e III inibem a adenilato ciclase, causando uma diminuição nos níveis de AMPC intracelular (Pin & Duvoisin, 1995; Schoepp et al., 1999). Os mGLURs estão presentes tanto nos terminais pré- e pós-sinápticos, como nas células gliais (Ozawa et al., 1998) (figura 4).

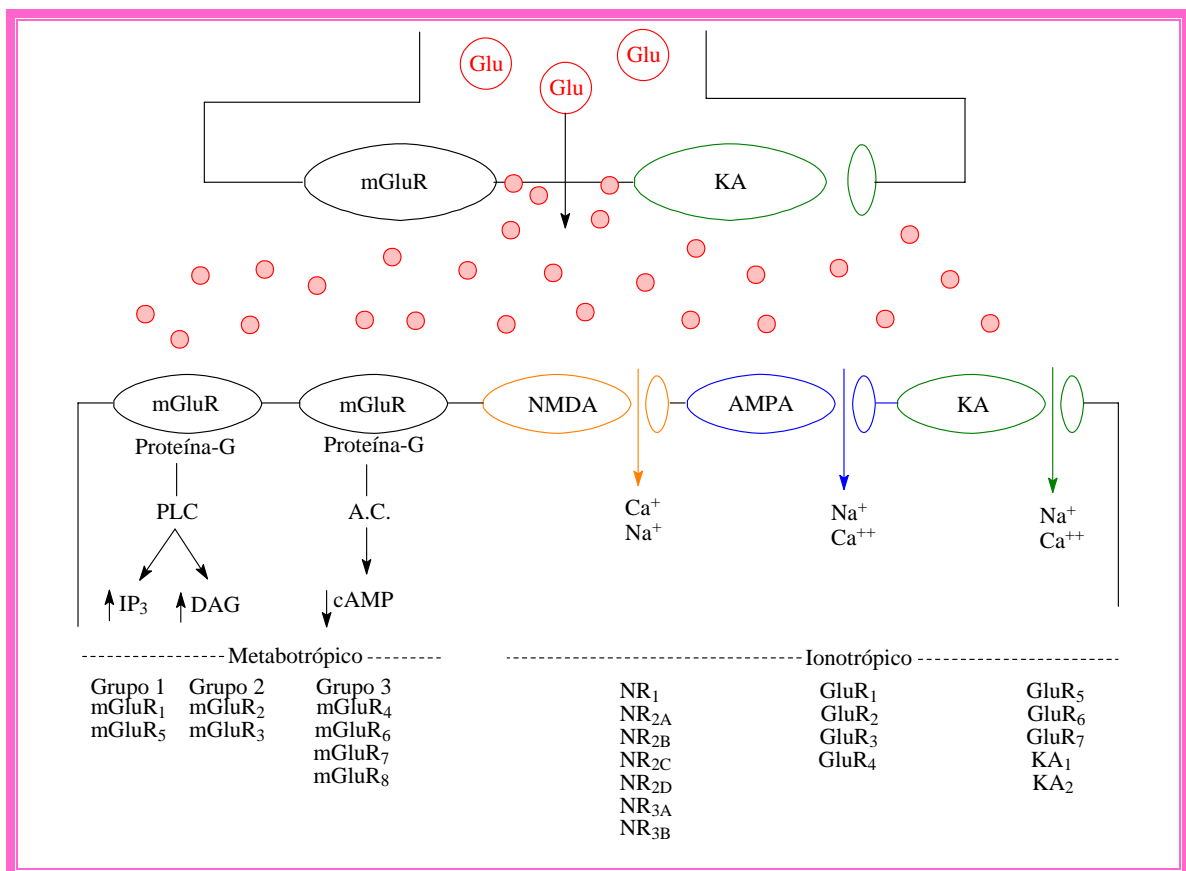


FIGURA 4: Ações do glutamato na fenda sináptica sobre os receptores glutamatérgicos.

2.3 A IMPORTÂNCIA DOS COMPOSTOS DICARBOXÍLICOS

L-glutamato e L-aspartato são compostos dicarboxílicos acíclicos e, em função disso, pode ocorrer uma variação na distância entre os grupos carboxílicos e o grupamento amino. A especificidade de ligação destes aminoácidos está diretamente relacionada ao isômero conformacional no sítio de ligação (Allan et al., 1990; Sutcliffe et al., 1996). Assim, dependendo da conformação do L-glutamato, este pode se ligar a receptores NMDA, AMPA, KA ou metabotrópicos, resultando numa ação/resposta específica, rápida ou lenta; ou ainda ser recaptado por transportadores presentes nas células pré-sinápticas ou gliais.

Os receptores ionotrópicos e metabotrópicos têm um papel importante em funções tanto nos indivíduos normais como em indivíduos portadores de doenças que afetam o SNC. Assim, estes receptores são alvos putativos para a intervenção terapêutica. Por isso, muitos cientistas têm se dedicado à pesquisa de compostos dicarboxílicos não-proteinogênicos e análogos ao L-glutamato, objetivando vislumbrar ligantes seletivos para estes receptores. Tais compostos deverão ser capazes de ativar, bloquear ou modular os subtipos de receptores glutamatérgicos, e assim se tornarem uma ferramenta farmacológica que possa ser utilizada no tratamento de doenças neurodegenerativas (Bräuner-Osborne et al., 2000).

2.3.1 COMPOSTOS DE CADEIA CÍCLICA E ESTRUTURA RÍGIDA:

Bridges et al. (1991) prepararam uma série de análogos não proteinogênicos do L-glutamato, com restrição conformacional, chamados de dicarboxilatos de pirrolidina. O objetivo para a síntese destes compostos foi introduzir o L-glutamato ou L-aspartato dentro de uma estrutura cíclica. A partir disso, identificaram o L-*trans*-2,4-dicarboxilato de pirrolidina (L-*trans*-2,4-PDC), inibidor seletivo de alta afinidade do transportador de L-glutamato Na⁺-dependente (Bridges et al., 1991). Entretanto, quando a carboxila do C4 foi posicionada no C3 gerando o L-*trans*-2,3-dicarboxilato de pirrolidina (L-*trans*-2,3-PDC) (Humphrey et al., 1994), este se tornou um inibidor fraco da captação de L-glutamato, mas uma potente excitotoxina *in vivo* e em culturas corticais de cérebro de ratos, por ativar receptores NMDA (Willis et al., 1996). Da mesma forma, o *cis*-5-metil-L-*trans*-2,3-dicarboxilato de pirrolidina e o *trans*-5-metil-L-*trans*-2,3-dicarboxilato de pirrolidina também são excitotoxinas que

atuam nos receptores NMDA, porém muito mais potentes, e atuam nas subunidades NR_{1A}/ NR_{2B} (Willis et al., 1997).

Outros compostos têm atraído o interesse da comunidade científica devido as suas pronunciadas atividades biológicas e farmacológicas. São os membros da família dos cainatos, dentre os quais os ácidos caínico, acromélico e domóico se destacam (Carpes, 2001). A atividade neuroexcitatória dos cainatos é atribuída principalmente pela sua atuação como um análogo conformacionalmente restrito do neurotransmissor L-glutamato e pela presença de substituintes insaturados no C4 do anel pirrolidínico, o que os tornam neurotoxinas mais potentes que o L-glutamato (Carpes, 2001). O ácido caínico foi o primeiro composto a mimetizar as seqüelas patológicas comportamentais da doença de Huntington (Coyle & Schwarcz, 1976). Além disso, o ácido caínico causa convulsões e morte neuronal em ratos recém-nascidos pré-tratados com lipopolissacarídeo (Lee et al., 2000) e induz lipoperoxidação (Kunz et al., 1999; Kim et al., 2000) e carbonilação protéica (Pennypacker et al., 1995).

O ácido domóico é conhecido por ser uma toxina encontrada em mariscos contaminados e, juntamente do ácido acromélico (Ishida & Shinozaki, 1988), são agonistas potentes dos receptores AMPA e KA (Hawkins et al., 1995; Larm et al., 1997). Crawford et al. (2000) demonstraram que o ácido domóico tem um IC₅₀ aproximadamente quatro vezes maior do que o do ácido caínico nos receptores KA. As pessoas contaminadas por essa excitotoxina apresentam disfunção neurológica aguda, incluindo convulsão, coma e, eventualmente morte (Teitelbaum et al., 1990). Aquelas pessoas que sobrevivem após terem ingerido alimentos contaminados podem desenvolver amnésia anterógrada, devido às lesões excitotóxicas, e perda neuronal no hipocampo e ao redor de estruturas temporais e límbicas (Teitelbaum et al., 1990).

O composto ácido L-*anti-endo*-3,4-metanopirrolidina-3,4-dicarboxílico (L-*anti-endo*-MPDC) é conhecido por ser um inibidor da captação de [³H]-L-glutamato em sinaptossomas de cérebro de ratos (Koch et al., 1999). Já o ácido (2R,4R)-4-aminopirrolidina-2,4-dicarboxílico [(2R,4R)-APDC] ativa o grupo II dos receptores metabotrópicos, mas não ativa os grupos I e III (Monn et al., 1996; Tückmantel et al., 1997). A substituição no N1 deste composto causa uma redução na afinidade pelo grupo II dos receptores metabotrópicos (Tückmantel et al., 1997; Kozikowski et al.,

1999) por isso, o 1-amino-APDC age como um agonista parcial no grupo II e o 1-benzil-APDC ativa o mGLUR₆ (Tückmantel et al., 1997).

Compostos que não apresentam um anel pirrolidínico, mas um anel monocíclico, que também confere uma restrição conformacional, tem afinidade por receptores metabotrópicos. O primeiro agonista estudado foi o ácido (1S,3RS)-1-aminociclopentano-1,3-dicarboxílico (*trans*-ACPD) (Palmer et al., 1989; Desai & Conn, 1990), sendo o enantiômero ativo que se mostrou ser seletivo para os receptores metabotrópicos, falhando sua atividade nos receptores ionotrópicos. Já o ácido L-aminociclobutano-*cis*-1,3-dicarboxílico causa inibição da captação do L-glutamato em sinaptossomas de córtex de ratos e, seu diastereoisômero, o ácido L-aminociclobutano-*trans*-1,3-dicarboxílico é um potente agonista dos receptores NMDA e incapaz de inibir a captação de L-glutamato (Fletcher et al., 1991).


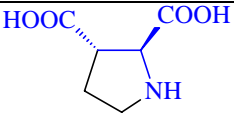
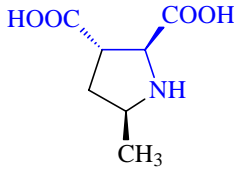
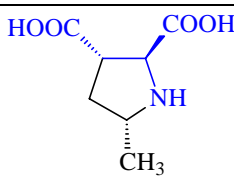
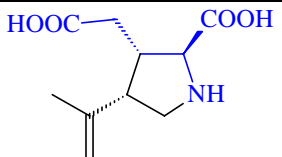
O L-CCG-I demonstrou apresentar atividade nos subtipos mGLUR₁, mGLUR₂ e mGLUR₄, porém uma ação agonista mais potente nos receptores do grupo II (Hayashi et al., 1992; Brabet et al., 1998) e o (2S,3R,4S)-2-carboxiciclopropilglicina (L-CCG-IV) é um potente agonista dos receptores NMDA (Shinozaki et al., 1989).

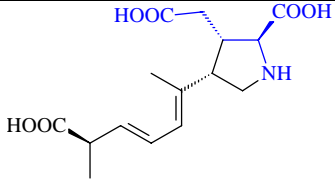
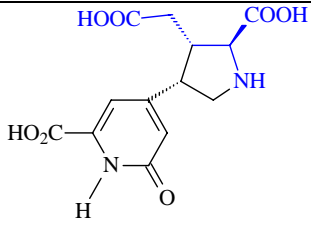
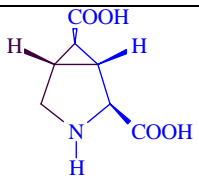
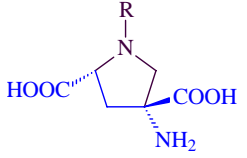
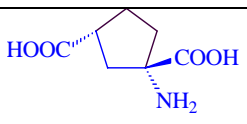
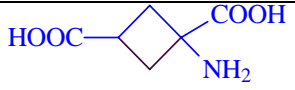
Já os compostos bicíclicos apresentam uma estrutura mais rígida que os monocíclicos. O ácido (1S,2S,5R,6S)-2-aminobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico (LY354740) possui uma alta afinidade pelo mGLUR₂ e mGLUR₃, e a potência deste agonista é na faixa nanomolar, porém na faixa micromolar ele ativa o mGLUR₆ e mGLUR₈, não apresentando afinidade pelos demais mGLURs (Monn et al., 1997; Schoepp et al., 1997, Monn et al., 1999). A síntese e farmacologia do ácido (1S,2S,4S,5S)-2-aminobiciclo[2.1.1]hexano-2,5-dicarboxílico (ABHx-I) foi demonstrada por Kozikowski et al. (1998). Este composto apresenta uma ação agonista comparável ao L-glutamato nos receptores metabotrópicos mGLUR₁ à mGLUR₆. Esta molécula é bastante rígida e adota uma conformação parecida a conformação estendida do L-glutamato (anti-anti). Isto sugere que o L-glutamato adote esta mesma conformação estendida nos mGLURs e que a seletividade pelo grupo não seja consequência das conformações diferentes, mas devido a outros fatores como o impedimento estérico (Kozikowski et al., 1998). Por exemplo, a alta seletividade do agonista LY354740 no grupo II com a não seletividade do agonista ABHx-I. Ambos adotam a conformação estendida (anti-anti) do L-glutamato (Tückmantel et al., 1997; Kozikowski et al., 1998). Entretanto, o LY354740 parece ocupar um volume “extra” maior comparado ao ABHx-I (Kozikowski et al., 1998).

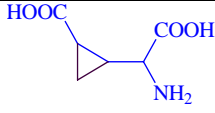
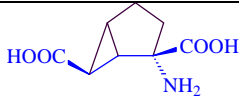
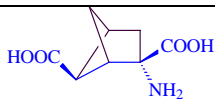
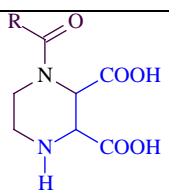
Concordando com isso, tem sido sugerido que os receptores metabotrópicos do grupo II podem aceitar este volume extra, enquanto os grupos I e III não (Kozikowski et al., 1998).

Um novo composto da classe das piperazinas foi sintetizado, o ácido 1-(fenantreno-2-carbonil)-piperazina-2,3-dicarboxílico (PPDA) que atua como um potente antagonista dos receptores NMDA, seletivo nas subunidades NR_{2C} e NR_{2D} (Feng, et al., 2004). Na tabela 1 são apresentados alguns compostos dicarboxílicos de cadeia cíclica e estrutura rígida, salientando nas estruturas a função análoga ao L-glutamato com suas respectivas atividades.

Tabela 1: Alguns compostos dicarboxílicos de cadeia cíclica e estrutura rígida.

ESTRUTURA QUÍMICA	Receptores NMDA	Receptores AMPA/KA	Receptores metabotrópicos	Transportadores
 L- <i>trans</i> -2,4-PDC				Inibidor
 L- <i>trans</i> -2,3-PDC	Agonista			
 <i>cis</i> -5-metil-L- <i>trans</i> -2,3-PDC	Agonista			
 <i>trans</i> -5-metil-L- <i>trans</i> -2,3-PDC	Agonista			
 Ácido caínico		Agonista		

ESTRUTURA QUÍMICA	Receptores NMDA	Receptores AMPA/KA	Receptores metabotrópicos	Transportadores
 <p>Ácido domóico</p>		Agonista		
 <p>Ácido acromélico</p>		Agonista		
 <p>L-<i>anti-endo</i>-MPDC</p>				Inibidor
 <p>R=H; (2R,4R)-APDC R=NH₃; 1-amino-APDC R=CH₂(C₆H₅); 1-benzil-APDC</p>			Agonistas	
 <p><i>trans</i>-ACPD</p>			Agonista	
 <p>Ácido L-aminociclobutano-<i>cis</i>-1,3-dicarboxílico</p>				Inibidor

ESTRUTURA QUÍMICA	Receptores NMDA	Receptores AMPA/KA	Receptores metabotrópicos	Transportadores
 (L-CCG-IV)	Agonista			
 (LY354740)			Agonista	
 ABHx-I			Agonista	
 R=fenantreno; PPDA	Antagonista			

Adaptado de Bräuner-Osborne et al. (2000) e Danbolt, (2001).

2.3.2 COMPOSTOS DE CADEIA ACÍCLICA E ESTRUTURA FLEXÍVEL:

O (2S,4R)-4-metil-glutamato apresenta afinidade seletiva pelos sítios de ligação do [³H]-KA (Gu et al., 1995), potente atividade agonista nos receptores homoméricos recombinantes iGLUR₅ e iGLUR₆ (Jones et al., 1997; Donevan et al., 1998) e uma potência significativa nos mGLURs. Já o (S)-4-metileno-L-glutamato e o (2S,4S)-metil-glutamato (a), são agonistas mais potentes que o L-glutamato nos mGLUR₂, com alguma atividade no mGLUR₁ e praticamente nenhuma atividade no mGLUR₄ (Bräuner-Osborne et al., 1997). Por outro lado, pode se obter antagonistas a partir de agonistas pela substituição de um grupo metil por cadeias laterais lipofílicas e volumosas. Os compostos pioneiros neste contexto são os ácido (2S,4S)-2-amino-4-(2,2-difeniletil)pentano-1,5-dióico (b) e o ácido (2S,4S)-2-amino-4-(4,4-1-difenil-1-butil)pentano-1,5-dióico (c) que são antagonistas seletivos no grupo II dos receptores metabotrópicos com potências na faixa micromolar (Wermuth et al., 1996; Escribano et al., 1998). O composto LY339434 é um agonista nos receptores KA subtipo iGLUR₅ (Small et al., 1998).

O composto NMDA não é produzido endogenamente e a sua administração intracerebroventricular (ICV) causa convulsões devido à ativação dos receptores NMDA, por isso este nome (Croucher et al., 1995). Já o D-aspartato se liga nos receptores NMDA com a mesma afinidade que o NMDA, mas a sua ação excitatória é mais fraca que a do NMDA, provavelmente porque o NMDA não é um substrato para os transportadores de L-glutamato (Hansen & Krogsgaard-Larsen, 1990; Hashimoto & Oka, 1997). O composto treo- β -hidroxiaspartato (THA) é um inibidor competitivo do transportador EAAT₁₋₄ do sítio de ligação do L-glutamato (Arriza et al., 1994) e induz um efeito adicional sobre os astrócitos por abolir a captação de glicose estimulada por L-glutamato de uma maneira não-competitiva e dependente da concentração (Debernardi et al., 1999). O D,L- treo- β -benziloxiaspartato (TBOA) é um inibidor competitivo do transportador de L-glutamato não-transportável (Shimamoto et al., 1998) e induz depleção de glutatona em culturas de neurônios hipocampais (Himi et al., 2002).

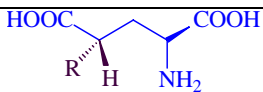
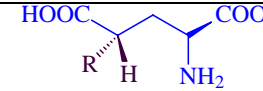
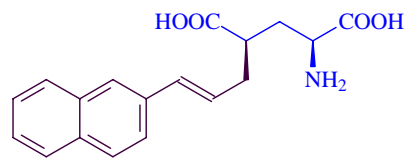
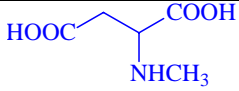
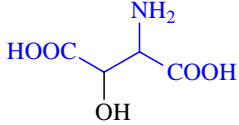
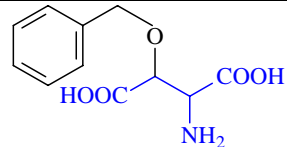
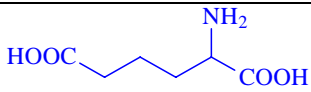
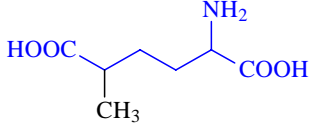
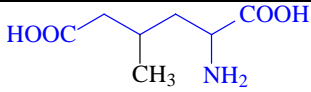
Os ácidos malônico e metilmalônico causam inibição do metabolismo energético, depleção de ATP e secundariamente, ativam receptores NMDA (McDonald & Schoepp, 1993; Behrens et al., 1995; Pavlakovic et al., 1995) já que suas ações neurotóxicas ou excitatórias são bloqueadas ou significativamente atenuadas por MK-801 ou AP-5, antagonistas do receptor NMDA (Zeevalk et al., 1995). Da mesma forma, o ácido succínico também exerce suas ações neurotóxicas aumentando os potenciais pós-sinápticos excitatórios de campo (PEPSs) em hipocampo de ratos em baixas concentrações. Tal efeito também é revertido por AP-5, mas não por CNQX (antagonista dos receptores AMPA e KA) e causa convulsão e letalidade que são prevenidos pela co-administração de MK-801. Por isso, este composto dicarboxílico é considerado um agonista parcial dos receptores NMDA (Roehrs et al., 2004).

Outros compostos dicarboxílicos que atuam na neurotransmissão glutamatérgica: o ácido guanidinosuccínico quando injetado intrahipocampalmente causa dano nesta estrutura e epilepsia (Pan et al., 1996). O ácido glutárico, um análogo estrutural do L-glutamato de cinco carbonos, causa convulsões (Lima et al., 1998), inibição da captação vesicular de [³H]-L-glutamato e estimula a captação astrocítica e a ligação de [³H]-L-glutamato em membranas plasmáticas de cérebro de ratos jovens (Porciúncula et al., 2004). Já os seus análogos com pequenas modificações na cadeia lateral como o ácido D-2-hidroxi-glutárico aumenta a

captação de [^3H]-L-glutamato em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos (Junqueira et al., 2004), é excitotóxico em culturas neuronais de pinto por ativar as subunidades NR₁/NR_{2A}, NR₁/NR_{2B} dos receptores NMDA (Kölker et al., 2002). E o ácido 3-hidroxi-glutárico induz convulsões e lesões estriatais em ratos (Mello et al., 2001) e interage com os receptores NMDA uma vez que ele aumenta a ligação de [^3H]-MK-801 em membranas plasmáticas de córtex de ratos jovens (Rosa et al., 2004). O ácido 2-amino adípico (2-AA), um análogo estrutural do L-glutamato de seis carbonos, em concentrações micromolar, inibe o antiporter glial de cistina/glutamato Na⁺-independente, o qual é o principal determinante dos níveis de L-glutamato extracelular no cérebro (Tsai et al., 1996; Pow, 2001). Já em concentrações milimolar, o 2-AA inibe o transportador de L-glutamato Na⁺-dependente (Pannicke et al., 1994; Robinson & Dowd, 1996; Danbolt, 2001), bloqueia a glutamina sintetase (McBean, 1994), impede a captação de L-glutamato em vesículas sinápticas (Fykse et al., 1992) e atua como agonista dos receptores NMDA (Hall et al., 1977). O derivado ácido (2S,5RS)-5-metil-2-aminoadípico também é um agonista dos receptores NMDA e o ácido (2R,4S)-4-metil-2-aminoadípico atua como um antagonista destes receptores (Guldbrandt et al., 2002; Guidetti & Schwarcz, 2003). Na tabela 2 são apresentados alguns compostos dicarboxílicos de cadeia acíclica e estrutura flexível, salientando nas estruturas a função análoga ou homóloga ao L-glutamato com suas respectivas atividades.

Tabela 2: Compostos dicarboxílicos de cadeia acíclica e estrutura flexível.

ESTRUTURA QUÍMICA	Receptores NMDA	Receptores AMPA/KA	Receptores metabotrópicos	Transportadores
 (2S,4R)-4-metil-glutamato		Agonista	Agonista	
 (S)-4-metileno-L-glutamato			Agonista	
 R=CH ₃ (a)			Agonista	

ESTRUTURA QUÍMICA	Receptores NMDA	Receptores AMPA/KA	Receptores metabotrópicos	Transportadores
 <p>R=CH₂CH(C₆H₅)₂ (b)</p>			Antagonista	
 <p>R= (CH₂)₃CH(C₆H₅)₂ (c)</p>			Antagonista	
 <p>LY339434</p>		Agonista		
 <p>N-metil-D-aspartato</p>	Agonista			
 <p>THA</p>				Inibidor
 <p>TBOA</p>				Inibidor
 <p>Ácido 2-amino adípico</p>	Agonista			Inibidor
 <p>Ácido 5-metil-2-aminoadípico</p>	Agonista			
 <p>Ácido 4-metil-2-aminoadípico</p>			Antagonista	

Adaptado de Bräuner-Osborne et al. (2000) e Danbolt, (2001).

2.4 FORMAÇÃO DAS ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO (EAO)

Em 1954, Gerschman et al. propuseram que a maior parte do dano provocado pelo oxigênio (O_2) poderia ser atribuído à formação de radicais livres de O_2 .

Do ponto de vista físico, um radical livre (RL) é definido como qualquer átomo ou molécula capaz de existir sob forma independente e que contém um ou mais elétrons desemparelhados (Del Maestro, 1980; Southorn & Powis, 1988; Halliwell & Gutteridge, 1999) (Figura 5). Os RLs podem ser formados pela adição ou pela perda de um elétron de uma substância não-radical.

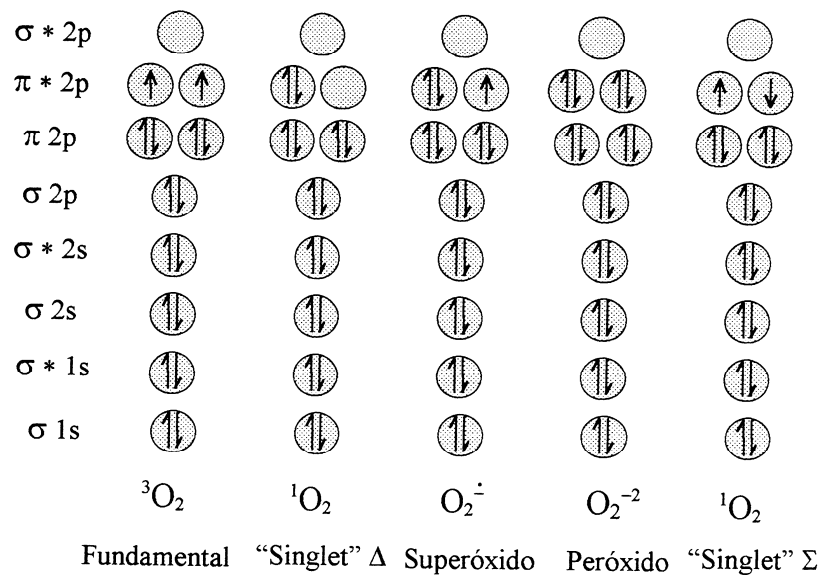
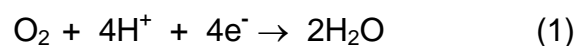


FIGURA 5: Configuração eletrônica das Espécies Ativas de oxigênio (EAO). Adaptado de Halliwell & Gutteridge, (1999).

Na mitocôndria, a citocromo oxidase promove a redução completa de uma molécula de O_2 em uma molécula de H_2O e, para isso, são necessários quatro elétrons (reação 1).

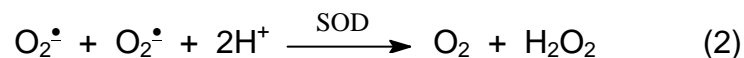


Mas, às vezes, o O_2 não consegue se transformar diretamente em H_2O , pois devido à sua configuração eletrônica, a molécula de O_2 tende, durante as reações, a receber um elétron de cada vez, formando uma série de intermediários tóxicos e

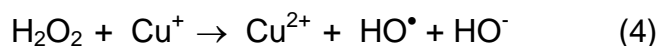
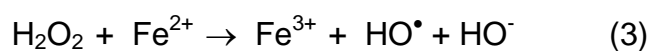
reativos (Meneghini, 1987), tais como: radical superóxido (O_2^{\bullet}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (HO^{\bullet}). O primeiro e o último são chamados de radicais livres, pois apresentam elétrons desemparelhados (figura 5). Já o H_2O_2 não é um radical livre, mas um metabólito de oxigênio parcialmente reduzido. Os metabólitos derivados de oxigênio são denominados, em conjunto, de espécies ativas de oxigênio (EAO) por causa de sua reatividade aumentada para as biomoléculas (Fischer, 1987).

O radical superóxido é o primeiro intermediário formado a partir da redução incompleta do O_2 molecular na formação de H_2O (Harris, 1992). A partir dele, outras EAO podem ser formadas, como o HO^{\bullet} e H_2O_2 (Armstrong et al., 1984; Esterbauer et al., 1986). O radical superóxido também pode ser formado a partir das enzimas que catalisam a formação de prostaglandinas (ciclooxigenases) e leucotrienos (lipooxigenases) (Machlin & Bendich, 1987).

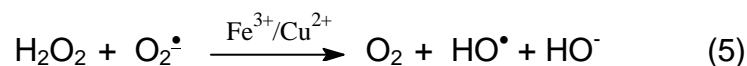
O H_2O_2 é um produto fisiológico, e sua formação ocorre na atividade metabólica normal (Chance et al., 1979). Em alguns órgãos a atividade celular leva à formação de H_2O_2 , tanto pelo peroxissomos quanto por enzimas citosólicas (Boveris & Chance, 1973; Chance et al., 1979). O H_2O_2 é sintetizado a partir do O_2^{\bullet} por dismutação, e esta reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (reação 2), a qual é encontrada em quantidades elevadas em algumas células dos mamíferos. Há uma forma CuZnSOD no citosol, enquanto a MnSOD está localizada na matriz mitocondrial (Fridovich, 1978; Marklund, 1988).



A mais reativa das EAO é o radical hidroxil, que pode ser formado pelo H_2O_2 quando reage com íons cobre (I) ou ferro (II), chamada de reação de Fenton (reações 3 e 4).



Os íons dos metais de transição podem catalisar a reação entre H_2O_2 e O_2^{\bullet} , conduzindo a produção de HO^{\bullet} . Esta reação é conhecida como reação de Haber-Weiss, catalisada pelo Fe (III) ou Cu (II) (reação 5).



2.4.1 REATIVIDADE DAS EAO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

Com exceção do H_2O_2 , a maioria das EAO são extremamente reativas e instáveis apresentando uma meia-vida muito curta, da ordem de frações de segundos. Em função da sua reatividade, a maioria dos RLs existem apenas em baixas concentrações (10^{-4} a 10^{-9} M) e não se distanciam do seu sítio de formação (Southorn & Powis, 1988).

O desbalanço entre a produção celular de EAO e o mecanismo de defesa antioxidante (Perry et al., 2002; Liu et al., 2003) pode causar prejuízo na função celular, apoptose e necrose (Bergendi et al., 1999; Norberg & Arnér, 2001), caracterizando o chamado “estresse oxidativo”. Apesar das EAO terem um importante papel biológico, já que elas eliminam as bactérias fagocitadas pelos neutrófilos (Packer et al., 1996), a produção excessiva pode causar danos celulares irreversíveis ao DNA, nas proteínas e lipídios de membrana (Bergendi et al., 1999).

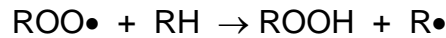
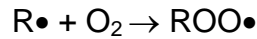
2.4.2 LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO)

A membrana celular é formada em grande parte por lipídios insaturados e proteínas e, por isso, é altamente vulnerável ao ataque das EAO (Halliwell, 1994).

A LPO consiste de reações em cadeia e são classicamente divididas em três fases: iniciação, propagação e terminação. Na reação de iniciação um RL é formado a partir de uma cisão homolítica de uma ligação covalente na molécula:



Na reação de propagação, também chamada de reação central, um RL reage com uma molécula estável originando outro RL como produto:



Na reação de terminação, dois RLs anulam seus elétrons solitários formando um produto estável (Boveris, 1998).



A LPO é um processo fisiológico contínuo que ocorre nas membranas celulares, pois além de ser um fator de renovação das membranas este processo é essencial na síntese de prostaglandinas e leucotrienos, bem como na fagocitose e pinocitose (Halliwell & Gutteridge, 1999). Por outro lado, a LPO descontrolada é um processo tóxico que resulta na deterioração das membranas biológicas e na formação de certos subprodutos com propriedades citotóxicas. Dentre eles, malondialdeído (MDA), gases hidrocarbonados como o etano e pentano, hidroperóxidos, isoprostanos (Praticò & Delanty, 2000). Todos estes subprodutos podem ser utilizados para medir indiretamente a produção de EAO (Punchard & Kelly, 1996). A maioria dos estudos publicados tem utilizado a técnica de TBARS, pois sua realização é fácil e econômica. Este método foi primeiramente descrito por Kohn & Liversedge (1944), mostrando uma reação colorimétrica do ácido tiobarbitúrico (TBA) com uma substância desconhecida formada durante a incubação aeróbica de homogeneizados de tecidos. Posteriormente, Patton & Kurtz (1951), demonstraram que esta substância desconhecida era o MDA, um produto secundário da peroxidação lipídica de ácidos graxos poliinsaturados, como descrito por Dahle et al., (1962) (figura 6). Porém, esta técnica parece insuficiente para avaliar a LPO em sistemas biológicos complexos (Praticò & Delanty, 2000), sendo então interessante complementar com outras análises bioquímicas, como a determinação de grupos carbonil nas proteínas oxidadas.

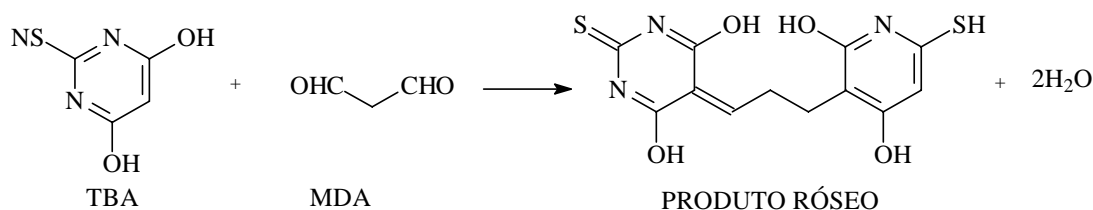


FIGURA 6: Reação colorimétrica do TBA com MDA produzindo um produto, o complexo MDA-TBA, de coloração rósea e duas moléculas de água.

2.4.3 OXIDAÇÃO DE PROTEÍNAS

A determinação de grupos carbonil nas proteínas oxidadas tem se tornado o método bioquímico mais utilizado na investigação de dano oxidativo protéico (Praticò & Delanty, 2000). As proteínas de membrana podem sofrer modificações de grupos tióis e nitrosilação de grupos fenólicos acarretando em fragmentação e quebra. Particularmente, os aminoácidos histidina, lisina e arginina são os principais alvos das EAO para a produção de grupos carbonil (>C=O). Os grupos carbonil formados nas proteínas oxidadas reagem com o composto 2,4-dinitrofenilhidrazina produzindo 2,4-dinitrofenilhidrazona (Praticò & Delanty, 2000), podendo este ser detectado por espectrofotometria, imunohistoquímica (Levine, 2002) e quimioluminescência (McIntosh et al., 1997).

As alterações que ocorrem nas proteínas de membrana podem modificar o transporte de íons e aumentar o Ca²⁺ intracelular (Dawson & Dawson, 1996), implicando no envolvimento das EAO na etiologia e progressão de várias doenças (Levine, 2002). Butterfield & Kanski, (2001), demonstraram que a oxidação de proteínas está aumentada na neurodegeneração relacionada com a idade, ou em modelos experimentais de doenças neurodegenerativas como as doenças de Alzheimer, Huntington e Parkinson.

2.4.4 SISTEMAS DE DEFESAS ANTIOXIDANTES CONTRA AS EAO

Os seres vivos apresentam mecanismos protetores para impedir o acúmulo de EAO e seus efeitos nocivos (Halliwell, 1994). Os sistemas de defesa antioxidantes podem ser constituídos por enzimas ou não. As principais enzimas antioxidantes são a SOD, catalase e glutathiona peroxidase. Estas enzimas previnem

o acúmulo de H_2O_2 e O_2^{\bullet} e conseqüentemente a produção de HO^{\bullet} , para o qual não existe nenhum sistema enzimático de defesa. Porém, existem substâncias capazes de neutralizar o HO^{\bullet} levando à formação de produtos menos tóxicos. Essas substâncias chamadas de “scavengers” ou varredores neutralizam o HO^{\bullet} nas fases de iniciação ou propagação da LPO. Existem também, substâncias chamadas “quenchers” ou apagadores que são capazes de absorver a energia de excitação dos RLs também neutralizando-os (Murphy & Sies, 1991).

Fazem parte das defesas não-enzimáticas os antioxidantes lipofílicos (tocoferóis, bioflavonóides e carotenóides) e antioxidantes hidrofílicos (glutathiona e ascorbato) (Heffner & Repine, 1989; Halliwell & Gutteridge, 1999).

2.4.5 AS EAO E O SNC

O SNC é altamente vulnerável ao ataque das EAO devido a vários fatores, como utilização de grande quantidade de glicose e oxigênio molecular, alto metabolismo energético, grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, baixa capacidade antioxidante e facilidade de peroxidação das membranas (Floyd, 1999). Além disso, a alta concentração de ferro em regiões específicas do cérebro (substância nigra, caudato, putâmen e globo pálido), favorece a LPO (Poli et al., 1993) resultando na formação de um foco epiléptico pós-traumático (Yamamoto et al., 2002). Este foco epiléptico pode ser prevenido por vitamina E ou ascorbato (Yamamoto et al., 2002). O ascorbato apresenta propriedades neuroprotetoras em alguns modelos experimentais de doenças neurológicas como Huntington (Rebec et al., 2003) e isquemia cerebral (McGregor et al., 2003). Em adição, a administração deste antioxidante atenua a LPO induzida por KA e a perda neuronal no hipocampo de ratos (McGregor et al., 1996) bem como, a diminuição do número e duração dos episódios convulsivos induzidos por ácido metilmalônico (Fighera et al., 1999). A metabolização de dopamina (Xia et al., 2001) e a estimulação de receptores NMDA pode levar a ativação da óxido nítrico sintase (NOS) que, pode reagir com o O_2^{\bullet} para formar peroxinitrito e, então promover a produção de HO^{\bullet} (Beckman et al., 1990) e conseqüentemente, a geração de espécies reativas de oxigênio (Krieglstein, 1997).

