



UFSM

Dissertação de Mestrado

**EFEITO DE INTERMEDIÁRIOS DO CICLO DE KREBS
SOBRE ALTERAÇÕES OXIDATIVAS INDUZIDAS POR
DIFERENTES AGENTES OXIDANTES**

Robson Luiz Puntel

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**EFEITO DE INTERMEDIÁRIOS DO CICLO DE KREBS SOBRE
ALTERAÇÕES OXIDATIVAS INDUZIDAS POR DIFERENTES
AGENTES OXIDANTES**

por

Robson Luiz Puntel

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Toxicológica, Área de Concentração em Bioquímica
Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica.

Santa Maria, RS, Brasil

2006

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 Dissertação de Mestrado

**EFEITO DE INTERMEDIÁRIOS DO CICLO DE KREBS SOBRE ALTERAÇÕES
OXIDATIVAS INDUZIDAS POR DIFERENTES AGENTES OXIDANTES**

elaborada por


Robson Luiz Puntel

como requisito parcial para a obtenção de grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica.

COMISSÃO EXAMINADORA



Cristina Wayne Nogueira
(Presidente/Orientador)
(UFSM)



Diogo Onofre Gomes de Souza
(UFRGS)



Juliano Ferreira
(UFSM)

Santa Maria, 30 de outubro de 2006.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por estar sempre guiando meu caminho.

À minha família, que sempre me incentivou para o aperfeiçoamento do meu conhecimento e acreditou em meu trabalho.

Aos meus orientadores Prof. João Batista Teixeira da Rocha e Prof^a. Cristina Wayne Nogueira, pela orientação e ensinamentos transmitidos ao longo de minha formação acadêmica, e principalmente pela amizade e confiança na execução deste trabalho. Além de minha gratidão, admiro-os por seu caráter e sua sabedoria na área de Bioquímica.

Ao Prof. Gilson Zeni pelos seus conhecimentos e exemplo de dedicação, e aos “guris” do seu laboratório, pela amizade e companheirismo.

Aos colegas do Laboratório da Prof^a Cristina, pela amizade e companheirismo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, que de alguma maneira contribuíram para a minha formação científica.

Ao Diogo Gabriel, o “Febem” que me ajudou a dar os “primeiros passos” no laboratório.

Aos colegas de laboratório, que muitas vezes tiveram que agüentar o meu mau-humor. Agradeço-os pelo convívio e conhecimento compartilhado ao longo desse período.

Aos membros da “Super Liga”, Daniel, Félix, Gustavo, Juliano, Matheus, Rafael, e também ao aspirante Alessandro. Agradeço-os pela amizade e conhecimento compartilhado.

Aos colegas que de laboratório que tomaram outros rumos, pelo companheirismo e amizade.

À Heloísa pela compreensão, amizade e companheirismo.

Aos funcionários Angélica e Rinaldo pela dedicação e competência com que realizam os seus trabalhos.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de realização deste curso.

À CAPES pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFEITO DE INTERMEDIÁRIOS DO CICLO DE KREBS SOBRE ALTERAÇÕES OXIDATIVAS INDUZIDAS POR DIFERENTES AGENTES OXIDANTES

AUTOR: Robson Luiz Puntel

ORIENTADORA: Cristina Wayne Nogueira

CO-ORIENTADOR: João Batista Teixeira da Rocha

LOCAL E DATA DA DEFESA: Santa Maria, Outubro de 2006.

Dados recentes na literatura têm relatado que alguns intermediários do ciclo de Krebs podem agir como potentes antioxidantes, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, em diversos sistemas pró-oxidantes. Porém, o(s) mecanismo(s) através dos qual(is) os intermediários do ciclo de Krebs exercem suas atividades antioxidantes não são completamente entendidas. Considerando a escassez de dados *in vitro* na literatura a respeito do efeito desses intermediários durante situações de estresse oxidativo, o presente trabalho tem como objetivo determinar o efeito de intermediários do ciclo de Krebs sob a peroxidação lipídica induzida por diferentes agentes pró-oxidantes *in vitro*, bem como investigar o(s) mecanismo(s) de ação dos mesmos. Primeiramente investigamos o efeito e o(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(is) o malonato e o ácido quinolínico modulam a produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em S1 de cérebro de ratos, *in vitro* (**artigo 1**). Os resultados obtidos mostraram um aumento na produção de TBARS induzido pelo malonato, o qual não foi modificado pela adição de cianeto de potássio, nem pelo MK-801. Por outro lado, o efeito pró-oxidante do ácido quinolínico foi significativamente prevenido pelo MK-801. Observamos ainda que o malonato foi capaz de formar complexos com íons ferrosos e que esses complexos não foram capazes de interferir nos ensaios da degradação da desoxirribose *in vitro*. Portanto, com base nos resultados encontrados, concluímos que o efeito pró-oxidante do malonato *in vitro* parece ser independente da atividade dos receptores NMDA. Os resultados sugerem que o efeito do malonato nessas condições deve-se principalmente a sua capacidade de interagir com íons ferro, modulando uma razão Fe^{2+}/Fe^{3+} que favorece a geração de radicais livres. Por outro lado, o efeito do ácido quinolínico parece ser devido à ativação dos receptores NMDA. Porém, não podemos excluir a participação dos íons ferro para a toxicidade do mesmo nessas condições. Outro foco deste estudo foi investigar o efeito de alguns intermediários do ciclo de Krebs na produção de TBARS induzida por ácido quinolínico ou ferro em S1 de cérebro de ratos *in vitro*, bem como investigar o(s) mecanismo(s) de ação dos mesmos (**artigo 2**). Os resultados mostraram que o oxaloacetato, o citrato, o succinato e o malato foram capazes de reduzir significativamente a produção de TBARS basal, bem como a induzida por ácido quinolínico ou ferro. Por outro lado, o α -cetoglutarato foi capaz de induzir *per se* um significativo aumento na produção de TBARS. A adição de cianeto de potássio, bem como o pré-tratamento do S1 por 10 min a 100°C aboliram completamente o efeito antioxidante

do succinato, sem interferir significativamente no efeito dos demais intermediários estudados. Todos os intermediários estudados, exceto o succinato, foram capazes de quelar íons ferro, porém somente o oxaloacetato e o α -cetogluturato foram capazes de prevenir a degradação da desoxirribose induzida por peróxido de hidrogênio. Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que o oxaloacetato, o malato o succinato e o citrato agem como antioxidantes sob condições basais ou em presença do ácido quinolínico ou ferro, enquanto que o α -cetogluturato age como um agente pró-oxidante *per se*. O mecanismo pelo qual o citrato, o malato e o oxaloacetato exercem seus efeitos antioxidantes parece ser devido à capacidade desses em interagir com íons ferro modulando o ciclo redox desse. Por outro lado, o efeito do succinato parece ser devido à atividade da enzima succinato desidrogenase (SDH).

Palavras-chave: Intermediários do ciclo de Krebs, Malonato, Ácido Quinolínico, Ferro, e Peroxidação Lipídica.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Post-Graduate Course in Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECT OF KREBS CYCLE INTERMEDIATES ON OXIDATIVE CHANGES INDUCED BY DIFFERENT OXIDANT AGENTS

AUTHOR: Robson Luiz Puntel

ADVISOR: Cristina Wayne Nogueira

CO-ADVISOR: João Batista Teixeira da Rocha

DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: Santa Maria, October 2006

Recent data from the literature have suggested that some Krebs cycle intermediates could act as potent antioxidant agents, both *in vitro* and *in vivo*, against a variety of pro-oxidant agents. However, the mechanism(s) involved in the antioxidant effect of Krebs cycle intermediates are not fully understood. Additionally, there are scarce data in the literature taking into account the *in vitro* effect of Krebs cycle intermediates during oxidative stress conditions. Thus, the aim of this study was to determine the effect of some Krebs cycle intermediates on lipid peroxidation induced *in vitro* by different pro-oxidant agents, and the mechanism(s) by which they act. Firstly, we investigated the effect and the mechanism(s) by which malonate and quinolinic acid modulate the thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) production *in vitro*, using rat brain S1 preparations (**Article 1**). The present results showed that the malonate-induced TBARS production was not changed by potassium cyanide or MK-801. However, the pro-oxidant effect of quinolinic acid was significantly prevented by MK-801. In addition we found that malonate was able to form complexes with iron ions (Fe^{2+}), but these complexes were not able to interfere with *in vitro* deoxyribose degradation assays. Based on the results presented, we conclude that malonate pro-oxidant activity *in vitro* seems to be independent of the NMDA receptors activity. Additionally, we suggest that the malonate effect, in these conditions, is due to its ability to form complexes with iron ions, thus modulating an adequate ratio $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ that could cause an increase in free radicals generation. In contrast, the quinolinic acid effect seems to be dependent of the NMDA receptors activation. However, we can not rule out the involvement of iron ions in quinolinic acid toxicity under our assay conditions. An other objective of this study was to investigate the effect of some Krebs cycle intermediates on quinolinic acid- or iron (Fe^{2+})-induced TBARS production in the rat brain S1 preparations, and the mechanism(s) by which they act (**Article 2**). The results showed that oxaloacetate, citrate, succinate, and malate were able to significantly prevent both basal and quinolinic acid- or iron-induced TBARS production. However, α -ketoglutarate induced *per se* a significant increase in basal TBARS production. The addition of potassium cyanide or the heat-treatment of S1 at 100°C during 10 min completely abolished the antioxidant succinate activity, without change the effect of other Krebs cycle intermediates studied. Except for succinate, all intermediates used in this study were able to form complexes with iron (Fe^{2+}) ions, however only oxaloacetate and α -ketoglutarate significantly prevented deoxyribose degradation induced by hydrogen peroxide. Based on the results presented, we concluded

that oxaloacetate, malate, succinate, and citrate could act as antioxidants under basal, and under quinolinic acid- or iron- induced TBARS production, whereas α -ketoglutarate act as a pro-oxidant agent *per se*. The mechanism(s) by which citrate, malate, and oxaloacetate acts seems to be related to their ability to form complexes with iron (Fe^{2+}) ions, thus modulating the iron redox cycle. In contrast, the succinate antioxidant effect seems to be dependent of the succinate dehydrogenase (SDH) activity.

Keywords: Krebs cycle intermediates, Malonate, Quinolinic Acid, Iron and Lipid Peroxidation.

LISTA DE FIGURAS

1. Introdução

Figura 1. Representação esquemática das reações do ciclo de Krebs. 4

Artigo 1

Figure 1. Effect of malonate on basal TBARS production. 20

Figure 2. Effect of succinate on basal or malonate-induced TBARS production. 21

Figure 3. Malonate and QA effect on the SDH activity. (a) Effect of malonate on SDH activity; (b) Effect of QA on SDH activity. 22

Figure 4. Chelating property of malonate. Effect of malonate on colored iron-phenantroline complex formation. 23

Figure 5. Effect of malonate on deoxyribose degradation. 23

Artigo 2

Figure 1. Effect of citrate, succinate, malate, oxaloacetate, α -ketoglutarate and oxalate in basal TBARS production on brain S1. 29

Figure 2. Antioxidant effect of citrate and succinate against basal or QA induced lipid peroxidation. (a) Antioxidant effect of citrate against basal or QA-induced TBARS production. (b) Antioxidant effect of succinate against basal or QA-induced TBARS production. 30

- Figure 3.** Antioxidant effect of oxaloacetate and malate, and pro-oxidative effect of α -ketoglutarate and oxalate on rat brain S1. 31
- Figure 4.** Role of iron on the pro-oxidant effect of QA in rat brain S1. 32
(a) Effect of DFO on basal or QA-induced TBARS production. (b) Effect of QA on basal or iron-induced TBARS production.
- Figure 5.** Antioxidant actions of Krebs cycle intermediates against iron-induced TBARS production. 33
- Figure 6.** Iron chelating properties of Krebs cycle intermediates. 34
- Figure 7.** Effect of Krebs cycle intermediates against deoxyribose degradation. 34
- Figure 8.** Effect of Krebs cycle intermediates when heat-treated preparations are used. 35
(a) Effect of Krebs cycle intermediates on basal or QA-induced TBARS production in fresh tissues preparations. (b) Effect of Krebs cycle intermediates on basal or QA-induced TBARS production in heat-treated preparations.

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Table 1. Effect of MK-801 on Basal or Malonate Induced-TBARS Production Either in Fresh or Brain S1 Preparations Treated at 100°C for 10 min. 21

Table 2. Effect of MK-801 on Basal or QA Induced-TBARS Production Either in Fresh or Brain S1 Preparations Treated at 100°C for 10 min. 22

Table 3. Effect of MK-801 on Basal or QA Induced TBARS Production in S1 Treated at different Temperatures for 10 min. 23

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP - Difosfato de Adenosina

AMP - Monofosfato de Adenosina

AQ – Ácido Quinolínico

ATP – Trifosfato de Adenosina

CAT – Catalase

DFO – Deferroxamina

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FAD – Dinucleotídeo de Flavina Adenina (forma oxidada)

GSH – Glutathiona Reduzida

GSSG - Glutathiona Oxidada

GTP – Trifosfato de Guanosina

KCN – Cianeto de Potássio

NAD⁺ – Dinucleotídeo de Nicotinamida Adenina (forma oxidada)

NADPH - Dinucleotídeo Fosfato de Nicotinamida Adenina (forma reduzida)

NMDA – N-metil-D-aspartato

RL – Radical Livre

S1 – Sobrenadante após centrifugação a 4000 g por 10 min (4°C)

SDH - Succinato Desidrogenase

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – Superóxido Dismutase

TBARS - Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
APRESENTAÇÃO	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O Ciclo de Krebs	1
1.1.1. A descoberta do ciclo	1
1.1.2. Considerações Gerais sobre o Ciclo de Krebs	1
1.2. Os Intermediários do Ciclo de Krebs Estudados	5
1.2.1. α -Cetoácidos	5
1.2.2. Citrato	6
1.2.3. Succinato e Malato	6
1.3. Agentes pró-oxidantes usados nesse estudo	7
1.3.1. Malonato	7
1.3.2. Ácido Quinolínico	8
1.3.3. Ferro	9
1.4. Espécies Reativas de Oxigênio e Peroxidação Lipídica (Estresse Oxidativo)	10
1.4.1. Espécies Reativas de Oxigênio	10
1.4.2. Peroxidação Lipídica	11
1.5. EROs e neurodegeneração	12
1.6. Isquemia e Intermediários metabólicos	12
1.6.1. Isquemia	12
1.6.2. Nível dos Intermediários e Episódios Isquêmicos	14
2. OBJETIVOS	15

2.1. Objetivo Geral	15
2.2. Objetivos Específicos	15
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS	16
3.1. Envolvimento dos receptores N-metil-D-aspartato na atividade pró-oxidante do ácido quinolínico, mas não na atividade pró-oxidante do malonato <i>in vitro</i>	17
3.1.1 – Artigo 1: Puntel RL, Nogueira CW, Rocha JBT. N-methyl-D-aspartate receptors are involved in the quinolinic acid, but not in the malonate pro-oxidative activity <i>in vitro</i> . <i>Neurochem. Res.</i> , 2005; 30: 417–424.	18
3.2– Modulação da produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em cérebro de ratos <i>in vitro</i> por intermediários do ciclo de Krebs	26
3.2.1 – Artigo 2: Puntel RL, Nogueira CW, Rocha JBT. Krebs cycle intermediates modulate thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in rat brain <i>in vitro</i> . <i>Neurochem. Res.</i> , 2005; 30: 225-235.	27
4. DISCUSSÃO	38
5. CONCLUSÕES	43
6. PERSPECTIVAS	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO**, está descrita uma sucinta revisão bibliográfica sobre os temas trabalhados nesta dissertação.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigos, os quais encontram-se no item **ARTIGOS CIENTÍFICOS**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos e representam a íntegra deste estudo.

Os itens, **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos contidos neste trabalho.

No item **PERSPECTIVAS** estão expostos os possíveis estudos para continuação do estudo do autor, referente a esse assunto.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **DISCUSSÃO** desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Ciclo de Krebs

1.1.1.A descoberta do ciclo

O Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos foi postulado primeiramente por Hans Krebs, em 1937, sob o nome original de “Ciclo do Ácido Cítrico”. Essa importante descoberta rendeu a Krebs o Prêmio Nobel, em 1953.

Já em 1936, Krebs, com base em estudos prévios, começou a estudar as inter-relações no metabolismo oxidativo dos vários ácidos di e tricarboxílicos em suspensões de músculos de vôo de pombos triturados. Em particular, ele procurou o significado biológico desses ácidos na oxidação da glicose (Lehninger, 1976).

A partir de uma série de experimentos simples, e argumentos inteligentes, Krebs postulou o Ciclo do Ácido Cítrico como a via principal para a oxidação dos carboidratos no músculo. Devido à incerteza, durante muitos anos, de ser ou não o ácido cítrico o primeiro ácido tricarboxílico formado na reação entre o piruvato e o oxaloacetato, o nome do ciclo foi mudado para ciclo do Ácido Tricarboxílico. Atualmente são usados como sinônimos os nomes “Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos”, “Ciclo do Ácido Cítrico”, ou “Ciclo de Krebs” (Lehninger, 1976).

1.1.2. Considerações Gerais sobre o Ciclo de Krebs

O Ciclo de Krebs é a mais importante via metabólica celular. O ciclo compreende uma série de reações químicas de importância central para todas as células que utilizam oxigênio durante o processo de respiração celular (organismos aeróbios). Nesses organismos, o Ciclo de Krebs é parte central das vias metabólicas envolvidas na conversão

química de carboidratos, ácidos graxos e proteínas em dióxido de carbono, água e energia útil para a(s) célula(s) (Stryer, 1988; Campbell, 1999; Nelson e Cox, 2002).

O Ciclo de Krebs está associado à cadeia respiratória, ou seja, um complexo de compostos transportadores de prótons (H^+) e elétrons que consomem o oxigênio (O_2) absorvido por mecanismos respiratórios, sintetizando água e gerando ATPs através do processo de fosforilação oxidativa (Stryer, 1988; Campbell, 1999; Nelson e Cox, 2002).

Esses processos ocorrem dentro das mitocôndrias, com as enzimas do Ciclo de Krebs dispersas na matriz e os transportadores de elétrons fixos nas cristas mitocondriais.

O Ciclo de Krebs inicia-se com a união de uma molécula de acetil (2C) com uma de oxaloacetato (4C) gerando o citrato (6C) que possui três carboxilas.

O Ciclo de Krebs pode ser dividido em oito etapas consecutivas:

1. **INÍCIO: condensação da aceti com o oxaloacetato, gerando citrato** (catalisada pela *citrato-sintase*).
2. **Isomerização do citrato em isocitrato** (catalisada pela *aconitase*).
3. **Oxidação do citrato a α -cetogluturato** (catalisada pela *isocitrato-desidrogenase*, utiliza o NAD^+ como transportador de dois elétrons liberados na reação, havendo o desprendimento de uma molécula de CO_2).
4. **Descarboxilação oxidativa do α -cetogluturato a succinil-CoA** (catalisada pelo complexo enzimático *α -cetogluturato-desidrogenase* e utiliza o NAD^+ como transportador de dois elétrons liberados na reação, havendo o desprendimento de mais uma molécula de CO_2).
5. **Desacilação do succinil-CoA até succinato** (catalisada pela *succinil-CoA sintase*, gera um GTP que é convertido, posteriormente, a ATP).
6. **Oxidação do succinato a fumarato** (catalisada pela *succinato-desidrogenase* (SDH), utiliza o FAD como transportador de dois elétrons liberados na reação)
7. **Hidratação do fumarato a malato** (catalisada pela *fumarase*).

8. **TÉRMINO:** *desidrogenação do malato com a regeneração do oxaloacetato* (catalisada pela enzima *malato-desidrogenase*, utiliza o NAD^+ como transportador de dois elétrons liberados na reação).

O Ciclo de Krebs fornece ainda precursores para uma série de moléculas, como certos aminoácidos e glicose. Sendo assim, algumas das reações do Ciclo de Krebs também são importantes para organismos anaeróbios (por exemplo, aqueles que fazem fermentação) (Stryer, 1988; Campbell, 1999; Nelson e Cox, 2002).

A Figura 1 (a seguir) ilustra esquematicamente todas as reações de uma volta completa no Ciclo de Krebs, bem como as enzimas envolvidas e os produtos que são liberados em cada uma das reações.

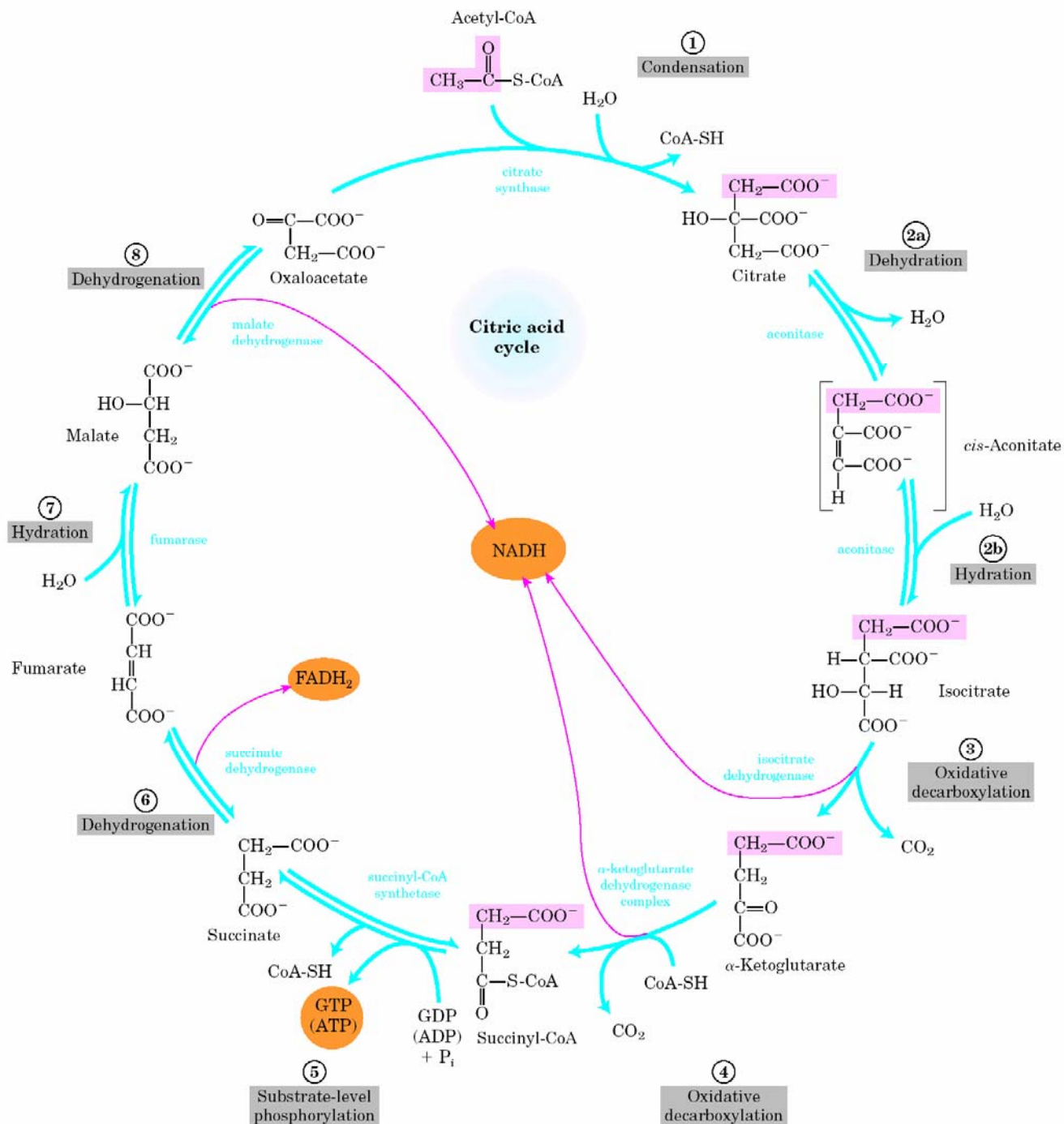


Figura 1. Representação esquemática das reações do Ciclo de Krebs

(Nelson e Cox, 2002).

1.2. Os Intermediários do Ciclo de Krebs Estudados

1.2.1. α -Cetoácidos

O α -cetogluturato é uma molécula composta por cinco átomos de carbono. O mesmo é formado a partir da descarboxilação oxidativa do isocitrato, numa reação catalisada pela *isocitrato-desidrogenase*. O α -cetogluturato é um importante composto biológico, e um intermediário chave do Ciclo de Krebs, o qual é encontrado naturalmente dentro das células. Uma de suas funções é combinar-se com a amônia para formar glutamato e posteriormente glutamina. Outra função do mesmo é combinar-se com o nitrogênio liberado dentro das células. O α -cetogluturato é um dos mais importantes transportadores de nitrogênio nas rotas metabólicas. Os grupos amino dos aminoácidos são transferidos para o α -cetogluturato por transaminação, e por esse transportado até o fígado onde ocorre o ciclo da uréia (Stryer, 1988; Campbell, 1999; Nelson e Cox, 2002).

O oxaloacetato, assim como a maioria dos intermediários do Ciclo de Krebs, é constituído por quatro carbonos. O oxaloacetato é formado a partir do malato, numa reação catalisada pela *malato-desidrogenase*. Posteriormente, uma nova volta no ciclo pode ser iniciada com a condensação do oxaloacetato com o acetil, catalisada pela *citrato-sintase* (Stryer, 1988; Campbell, 1999; Nelson e Cox, 2002).

Nas plantas, o oxaloacetato pode, também, ser formado a partir da condensação do CO₂ com fosfoenol piruvato, catalisada pela *oxaloacetato descarboxilase*.

Dados recentes na literatura têm indicado que o α -cetogluturato (intermediário do Ciclo de Krebs) inibe o estresse oxidativo induzido tanto *in vitro* (Desagher e cols., 1997; Sokolowska e cols., 1999) quanto *in vivo* (Velvizhi e cols., 2002 a; Velvizhi e cols., 2002 b). Da mesma forma, o α -cetogluturato e o oxaloacetato (α -cetoácidos) podem prevenir danos ao DNA mitocondrial e convulsões induzidas por ácido cáínico em camundongos (Yamamoto e Mohanan, 2003).

1.2.2. Citrato

O citrato (forma ionizada do ácido cítrico) é o primeiro intermediário do Ciclo de Krebs. Esse é formado a partir da condensação do oxaloacetato com o acetil, na reação catalisada pela *citrato-sintase* (primeira reação do Ciclo de Krebs). Como intermediário do Ciclo de Krebs, está envolvido na conversão metabólica de carboidratos, ácidos graxos e proteínas na maioria dos organismos vivos (Stryer, 1988; Campbell, 1999; Nelson e Cox, 2002).

O ácido cítrico (forma não-ionizada) é um ácido relativamente forte, e solúvel em água. O ácido cítrico bem como seus sais são amplamente usados, pois não são tóxicos e são facilmente biodegradáveis. Esse ácido é encontrado principalmente em frutas cítricas, mas também em outros tipos de frutas, em legumes e nos tecidos e fluídos animais, nos quais pode estar na forma ácida livre, ou complexado com íons ferro.

O ácido cítrico é amplamente usado nas indústrias farmacêuticas e alimentícias. Nessas, é usado para quelar metais essenciais, além de ajudar na redução do pH. Dessa forma, esse ácido contribui para retardar a atividade enzimática ajudando na conservação dos alimentos. Já na indústria farmacêutica, entre outros se destaca o uso do ácido cítrico como anticoagulante.

O citrato forma complexos com íons ferrosos (Fe^{2+}) ou férricos (Fe^{3+}), os quais podem ser ativos em sistemas biológicos (Baker e Gebicki, 1986). Esse ácido orgânico pode baixar os níveis de ferro através da quelação, ou aumentar sua disponibilidade através de reações redox (Abrahamson e cols., 1994). Têm-se relatos que o aumento no ciclo redox dos complexos de ferro pode levar à geração de radicais livres catalisada por ferro, à peroxidação lipídica, à distrofia axonal, à necrose e à morte celular apoptótica (Chiueh e cols., 1993; Gutteridge, 1994).

1.2.3. Succinato e Malato

O succinato é uma molécula com quatro carbonos. O succinato é formado a partir do succinil-CoA, na reação catalisada pela *succinil-CoA sintase*. O succinato é posteriormente oxidado a fumarato pela SDH.

Estudos prévios têm mostrado que o succinato inibe a peroxidação lipídica induzida por uma variedade de agentes pró-oxidantes (Takayanagi e cols., 1980; Bindoli e cols., 1982; Cavallini e cols., 1984). Em todos esses casos, a proteção oferecida por succinato é atribuída à redução da coenzima Q (ubiquinol - coenzima Q no estado reduzido) através da atividade da SDH. O ubiquinol, por sua vez age como antioxidante em sistemas biológicos (Bindoli e cols., 1982; Cavallini e cols., 1984).

O malato é constituído por quatro carbonos. O mesmo é originado a partir do fumarato pela ação da enzima *fumarase*. Posteriormente, o malato é oxidado a oxaloacetato por ação da *malato-desidrogenase* (Stryer, 1988; Campbell, 1999; Nelson e Cox, 2002).

O ácido málico é um ácido dicarboxílico de sabor azedo. Na sua forma ionizada, forma o malato, que juntamente com os demais intermediários do Ciclo de Krebs está envolvido na conversão metabólica de carboidratos, ácidos graxos e proteínas na maioria dos organismos vivos (Stryer, 1988; Campbell, 1999; Nelson e Cox, 2002).

Da mesma maneira que o succinato, o malato age como antioxidante prevenindo a peroxidação lipídica. Seu efeito é também atribuído à redução da coenzima Q (Vianello e cols., 1986). Porém, nesse caso, a formação do ubiquinol é devido à atividade da enzima *malato-desidrogenase*.

1.3. Agentes pró-oxidantes usados nesse estudo

1.3.1. Malonato

O cérebro contém concentrações substanciais de malonato livre (0,2 mM), mas pouco é conhecido a respeito da origem desse ácido dicarboxílico e sua importância biológica.

O malonato é um inibidor reversível da SDH (EC 1.3.99.1), uma enzima chave no metabolismo oxidativo, devido à sua semelhança estrutural com o substrato da enzima, o succinato (Maragos e Silverstain, 1995; Shulz e cols., 1996). Sendo assim, seu acúmulo prejudica o metabolismo aeróbio.

O potencial de membrana é um importante modulador de excitotoxicidade, e sua manipulação tem sido proposta como um mecanismo pra explicar a ligação entre inibição metabólica e excitotoxicidade (Beal e cols., 1993; Greene e Greenamyre, 1996).

O malonato ao inibir a SDH, leva a uma interrupção da fosforilação oxidativa e, por consequência, a uma depleção nos níveis de adenosina trifosfato (ATP). Nessas condições, ocorre uma despolarização pela falência de várias ATPases, principalmente da Na^+/K^+ /ATPase (Greene e cols., 1993), que mantêm a tensão e o gradiente de íons através da membrana plasmática. Ou seja, a inibição da SDH causada pelo malonato leva à disfunção mitocondrial, geração de radicais livres, excitotoxicidade secundária e apoptose (Dedeoglu e cols., 2002).

A neurotoxicidade associada com a administração intraestriatal de malonato é mediada quase que exclusivamente pela ativação indireta dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (Beal e cols., 1993; Greene e cols, 1993; Henshaw e cols., 1994; Greene e Greenamyre, 1995). Porém, o envolvimento dos receptores NMDA na toxicidade causada por malonato é controverso.

Estudos têm demonstrado que a administração do antagonista de receptores NMDA (MK-801) reduz o volume das lesões estriatais induzida por malonato. Porém, esse não é capaz de bloquear a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que sugere que a ativação de tais receptores não leva a um aumento na geração de EROs (Ferber e cols., 1999; Zeevalk e cols., 2000). Por outro lado, estudos demonstram claramente que a ativação dos receptores NMDA pode estar envolvida na geração de EROs, os quais contribuiriam para o estresse oxidativo induzido por malonato (Santamaría e Rios, 1993; Rodríguez- Martínez e cols., 2000).

1.3.2. Ácido Quinolínico

A rota da quinurenina é a principal rota do metabolismo do triptofano em mamíferos e ocorre principalmente no fígado. Um dos metabólitos dessa rota é o ácido quinolínico (AQ) (Moroni, 1999).

O AQ é encontrado no cérebro de ratos e humanos e pode estar envolvido na etiologia de algumas doenças neurodegenerativas de humanos, como a doença de

Huntington e a epilepsia (Moroni e cols., 1986; Schwarz e cols., 1988). De particular importância, a administração intracerebral de AQ causa neurodegeneração em mamíferos (Rodríguez-Martinez e cols., 2000). Sendo assim, o mecanismo através do qual o AQ induz neurotoxicidade parece envolver a superativação dos receptores NMDA, tanto por estimular pré-sinápticamente a liberação de aminoácidos neurotransmissores excitatórios, ou por ação pós-sináptica (Santamaría e Ríos, 1993). Essa ativação causaria uma entrada excessiva de cálcio nos neurônios (Rodríguez-Martinez e cols., 2000), promovendo a peroxidação lipídica e ativando uma série de processos intracelulares dependentes de cálcio (Rodríguez-Martinez e cols., 2000).

A participação dos receptores NMDA na toxicidade induzida pelo AQ é sustentada pelo fato do MK-801 (antagonista seletivo do receptor NMDA) bloquear a peroxidação lipídica induzida pela administração intraestriatal de AQ (Santamaría e Ríos, 1993; Rodríguez-Martinez e cols., 2000).

Contudo, a atividade pró-oxidante do AQ *in vitro* parece também ser dependente dos íons ferrosos (Stípek e cols., 1997).

1.3.3. Ferro

O ferro desempenha um papel importante nos processos metabólicos dos animais, sendo um constituinte vital nas células de todos os mamíferos. O ferro está também presente em algumas enzimas que catalisam mecanismos de oxidação celular. No homem, os órgãos mais ricos em ferro são o fígado e o baço. Embora em menor quantidade, é encontrado também nos ossos, na medula, nos rins e nos intestinos.

O ferro é de grande importância nos sistemas biológicos, onde participa de uma grande variedade de reações de transporte de elétrons, geralmente no estado de oxidação II e III. Porém, esses íons podem estimular a produção de radicais livres por diferentes mecanismos (Braughler e cols., 1986; Minotti e Aust, 1987; Minotti e Aust, 1992):

- a) por degradar hidroperóxidos lipídicos pré-existentes (ROOH) nos tecidos, formando o radical lipídico alcoxil (RO);

- b) por participar nas reações do tipo Fenton produzindo radicais hidroxil (OH^\cdot); ou
- c) por formar complexos com oxigênio, tal como os complexos $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2\text{-Fe}^{3+}$, os quais são responsáveis por iniciar as reações de peroxidação lipídica (Oubidar e cols., 1996).

Além disso, dados na literatura sugerem que a razão $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ é um fator fundamental na iniciação e propagação das reações de peroxidação lipídica (Braugher e cols., 1986). Assim, compostos capazes de interagir com íons ferrosos (II) ou férricos (III) podem ajustar indiretamente a atividade desses íons por modular diferentes razões $\text{Fe(II)}/\text{Fe(III)}$.

1.4. Espécies Reativas de Oxigênio e Peroxidação Lipídica (Estresse Oxidativo)

1.4.1. Espécies Reativas de Oxigênio

As células estão continuamente produzindo radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) como parte do processo metabólico. Tais espécies são capazes de gerar estresse oxidativo em consequência de suas propriedades oxidantes.

As principais EROs vinculadas ao estresse oxidativo são o radical ânion superóxido (O_2^\cdot), o radical hidroxil (OH^\cdot), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO^\cdot). Estes são neutralizados por um elaborado sistema de defesa antioxidante que pode ser enzimático (a catalase, a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase) ou não-enzimático (as vitaminas A, E, e C, flavonóides, ubiquinonas e a glutathione reduzida- GSH) (Alexi e cols., 1998; Gianni e cols., 2004). Neste contexto, o estado de estresse oxidativo pode resultar tanto de um aumento na produção de EROs quanto da redução da capacidade antioxidante celular total. Ou seja, a ocorrência de um dano oxidativo depende de um desequilíbrio entre a produção de EROs e a atividade das defesas antioxidantes (Halliwell, 1992; Dawson e Dawson, 1996).

1.4.2. Peroxidação Lipídica

As membranas biológicas apresentam uma estrutura geral comum. Essas são constituídas de uma bicamada lipídica as quais estão associadas a proteínas. As proteínas presentes na membrana celular são responsáveis pelo transporte de moléculas específicas através da bicamada lipídica. Além disso, essas proteínas podem agir como catalisadoras de reações associadas às membranas, como a síntese de ATP (Alberts e cols., 1994).

As membranas biológicas são constituídas principalmente por fosfolipídeos, os quais possuem uma cabeça polar e duas caudas hidrofóbicas. Geralmente, as caudas hidrofóbicas são compostas por ácidos graxos, que podem diferir no comprimento e na configuração em que se apresentam, podendo uma das caudas apresentar uma ou mais ligações duplas (insaturações) (Alberts e cols., 1994; Halliwell e Gutteridge, 1989).

Muitos compostos são metabolicamente ativados para intermediários reativos que são responsáveis por iniciar eventos tóxicos. Um tipo particular de intermediário reativo é o radical livre (RL).

Os RL são moléculas que tem um elétron ímpar (desemparelhado) na sua órbita externa (derivadas geralmente do oxigênio). Esta molécula se caracteriza por ser altamente instável, por ter uma vida média muito curta, medida em microssegundos, e por procurar sua estabilidade através do pareamento de seus elétrons. Os RL são espécies eletrofílicas extremamente reativas que podem reagir com os componentes celulares (Josephy, 1997; Timbrell, 2000). Os RL são gerados por uma variedade de processos, podendo atacar uma diversidade de biomoléculas alvo, tais como o DNA, os lipídeos e as proteínas.

Conforme mencionado anteriormente, uma fonte importante desses elétrons são os ácidos graxos insaturados encontrados na dupla camada de lipídeos das membranas celulares, que são vitais para o funcionamento da célula. Quando os RL reagem com esses ácidos graxos insaturados modificam os lipídeos e a membrana perde suas características arquitetônicas, tornando-se menos firme e menos flexível, criando-se verdadeiras fendas iônicas que alteram sua semipermeabilidade, o que favorece a entrada e saída indiscriminada de metabólitos e detritos da célula, provocando sua ruptura e lise com necrose (Josephy, 1997; Timbrell, 2000).

1.5. EROs e neurodegeneração

Trabalhos têm atribuído a perda celular associada às doenças neurodegenerativas à apoptose, um processo que está intimamente associado à sinalização celular envolvendo intermediários reativos de oxigênio (Beal, 1996; Mailly e cols., 1999). Estudos bioquímicos sugerem que as reações de oxidação podem ser importantes em patologias cerebrais (Ames e cols., 1993), e estão associadas com um desbalanço da regulação redox no sistema nervoso central (SNC) (Weber, 1999).

A neurodegeneração pode ocorrer como uma consequência da interação cooperativa de pelo menos três mecanismos neurotóxicos: o comprometimento metabólico, a excitotoxicidade e o estresse oxidativo (Alexi e cols., 1998; Kowaltowski e cols., 2001).

1.6. Isquemia e Intermediários metabólicos

1.6.1. Isquemia

Sabe-se que episódios isquêmicos são acompanhados de um aumento na geração de EROs (Cao e cols., 1988; Sakamoto e cols., 1991). Sob condições normais o sistema antioxidante endógeno (tanto enzimático quanto não-enzimático) é capaz de neutralizar as EROs produzidas durante o metabolismo basal. Porém, em situações patológicas, tais como durante os episódios isquêmicos esse sistema de defesa não é capaz de neutralizá-las completamente. Essa “ineficiência” do sistema antioxidante é devido tanto à superprodução dessas EROs, quanto à inativação das enzimas antioxidantes (catalase - CAT e superóxido dismutase - SOD) e ao consumo dos antioxidantes não enzimáticos (vitaminas C e E) (Chan, 1996).

Demopoulos e colaboradores, em 1977, foram os primeiros a evidenciar o papel patogênico do processo de peroxidação lipídica induzido por EROs durante danos cerebrais isquêmicos (Demopoulos e cols., 1977). Desde então, muitos trabalhos (Haliwell, 1992; Blomgren e cols., 2003; Wang e Lo, 2003; Adibhatla e Hatcher, 2006; Gottlieb e cols.,

2006; Gupta e Sharma, 2006) têm demonstrado o envolvimento dessas nos danos associados a essas condições.

Piantadosi e Zhang demonstraram que as EROs são geradas principalmente nas mitocôndrias dos tecidos injuriados (Piantadosi e Zhang, 1996). Desde então, tem-se demonstrado que existe uma correlação entre os danos isquêmicos e a disfunção mitocondrial (Zoratti e Szabo, 1995). Além das mitocôndrias, acredita-se também que células inflamatórias, e também enzimas (i.e. xantina oxidase e ciclooxigenases) (Piantadosi e Zhang, 1996) possam estar envolvidas na geração de EROs durante episódios isquêmicos. Acredita-se, ainda, que o aumento na concentração extracelular de glutamato e aspartato possa contribuir para o aumento na geração de EROs durante os episódios isquêmicos (Yang e cols., 1996).

A acidose metabólica resultante desses períodos de isquemia também pode levar a um aumento na geração de EROs. Esse aumento na geração de EROs está relacionado principalmente a liberação do ferro de seus sítios de ligação (Siesjö e cols., 1985; Rehncrona e cols., 1989; Bralet e cols., 1992). Nesse contexto, Siesjö e colaboradores demonstraram que uma diminuição no pH do tecido cerebral (durante episódios de disfunção metabólica – tais como a isquemia) é acompanhado de um aumento na formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de dienos conjugados (Siesjö e cols., 1985).

Existem ainda evidências mostrando que a superatividade do sistema de transporte dos aminoácidos excitatórios e a estimulação excessiva dos receptores NMDA estão envolvidas na injúria neuronal isquêmica (Chiang e cols., 2006).

Os antioxidantes são capazes de amenizar os danos observados durante episódios isquêmicos, confirmando o envolvimento das EROs no processo degenerativo associado a essas condições (Cao e cols., 1988; Liu e cols., 1989; Oliver e cols., 1990). Considerando o que foi exposto anteriormente acredita-se que intervenções bioquímicas e farmacológicas que tenham por objetivo diminuir ou mesmo prevenir a disfunção mitocondrial associada aos danos isquêmicos possa ser terapêuticamente viável para reduzir os danos associados a essas condições (Suleiman e cols., 2001). Nesse contexto, Sakamoto e colaboradores, demonstraram o papel protetor do succinato em um modelo de isquemia/reperfusão cardíaca (Sakamoto e cols., 1998).

1.6.2. Nível dos Intermediários e Episódios Isquêmicos

Sabe-se que os episódios isquêmicos são acompanhados de uma diminuição no metabolismo energético (Gibson e cols., 1981). Goldberg e colaboradores demonstraram que os níveis dos intermediários do Ciclo de Krebs são alterados durante essas condições (Goldberg e cols., 1966). Estes autores também demonstraram que os níveis do citrato, α -cetogluturato e oxaloacetato diminuíram de 15 a 60%, enquanto os níveis de succinato e fumarato aumentaram 40%. Porém os dados encontrados na literatura são contraditórios. Alguns trabalhos mostram que os episódios isquêmicos são seguidos de uma aparente depleção nos níveis de glicose, oxaloacetato, ATP, fosfato de creatina, piruvato, citrato e α -cetogluturato e de um acúmulo de frutose-1, 6-difosfato, lactato, succinato, ADP e AMP (Folbergrová e cols., 1974; Hoyer e Krier, 1986). Contudo, Medvedeva e colaboradores mostraram que os níveis de citrato estão aumentados, enquanto o de succinato diminuído após o período isquêmico (Medvedeva e cols., 2002).

Tendo em vista que os níveis dos intermediários metabólicos encontram-se alterados durante episódios os isquêmicos e também em situações de disfunção metabólica, estudos são necessários para determinar o efeito desses intermediários nessas situações, uma vez que essas são acompanhadas de um aumento acentuado na geração de EROs, bem como na liberação intracelular dos íons ferro.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar o efeito, bem como o(s) mecanismo(s) através do(s) qual(is) o citrato, succinato, malato, oxaloacetato e α -cetogluturato (Intermediários do Ciclo de Krebs) exercem seus efeitos antioxidantes em diferentes sistemas pró-oxidantes *in vitro*.

2.2. Objetivos Específicos

- Investigar o(s) mecanismo(s) através do(s) qual(is) o malonato e o ácido quinolínico exercem sua atividade pró-oxidante *in vitro*;
- Determinar o efeito do citrato, succinato, malato, oxaloacetato e α -cetogluturato sobre a produção de TBARS basal, induzida por ferro(II), ou ácido quinolínico;
- Investigar o(s) mecanismo(s) através do(s) qual(is) esses intermediários exercem seus efeitos.

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigos científicos, os quais encontram-se aqui organizados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos. Os **artigos 1 e 2** estão dispostos na forma que foram publicados na edição da revista científica.