



**UFSM**

**Dissertação de Mestrado**

**EFEITO DAS POLIAMINAS SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO  
INDUZIDA POR NEUROTOXINAS EM ENCÉFALO DE RATOS**

---

**Nádia Aléssio Velloso Bellé**

**CMBT**

**SANTA MARIA – RS - BRASIL**

**2004**

**EFEITO DAS POLIAMINAS SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO  
INDUZIDA POR NEUROTOXINAS EM ENCÉFALO DE RATOS**

---

por

**Nádia Aléssio Velloso Bellé**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Bioquímica  
Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito  
parcial para a obtenção do grau de  
**MESTRE em Bioquímica Toxicológica.**

**CMBT**

**SANTA MARIA – RS – BRASIL**

**2004**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Curso de Mestrado em Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO DAS POLIAMINAS SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO  
INDUZIDA POR NEUROTOXINAS EM ENCÉFALO DE RATOS**

elaborada por

**Nádia Aléssio Velloso Bellé**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Maribel Antonello Rubin  
(Orientadora)**

---

**Carlos Severo Dutra Filho**

---

**Ionara Rodrigues Siqueira**

**Santa Maria, 16 de janeiro de 2004**

Se as coisas são intangíveis ... ora!  
não é motivo para não querê-las ...  
Que tristes os caminhos, se não fora  
a mágica presença das estrelas!

Mário Quintana

Meus queridos pais, Paulo e Elda: a vocês, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, não basta agradecer. A vocês que me iluminaram os caminhos obscuros com amor e dedicação para que eu prosseguisse sem medo. A vocês, que se doaram por inteiro e sacrificaram seus sonhos e anseios para eu realizar os meus. Dedico, pois, esta vitória a vocês!

## AGRADECIMENTOS

Antes de mais nada, agradeço a Deus, que desde o início de minha caminhada esteve comigo. Dias e noites se passaram. Vitórias foram conquistadas. Derrotas foram superadas. A Vós, que me deste a vida e a vocação, o meu eterno agradecimento.

Agradeço aos meus orientadores, professores Maribel e João Batista, pelo porto seguro no qual eu sempre me aportava nos momentos de desorientação. Agradeço pela dedicação, pela confiança e pela oportunidade de crescimento.

Ao Emerson, por estar ao meu lado ... pelo amor e apoio ao longo deste anos, contribuindo para esta conquista ... minha gratidão.

À minha família, especialmente Paula, Lígia, Brizola, Renato, Tio Atílio e minha avó Maria agradeço pelo apoio, incentivo, companheirismo e carinho.

Às minhas queridas “papõezinhas”, Gerusa Duarte Dalmolin e Graciela Fonini, agradeço por representarem meus braços direito e esquerdo na concretização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório, pela ajuda, pelo apoio e pelos momentos descontraídos.

Aos demais professores do CMBT, pelo muito que aprendi com vocês.

Agradeço ao Prof. Aron Ferreira da Silveira pelo apoio, pela ajuda e pelo incentivo os quais foram essenciais para minha perseverança em ingressar no CMBT.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de crescimento, aprendizagem e progresso.

Agradeço à CAPES, pelo apoio financeiro.

# SUMÁRIO

<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>xi</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>xii</b>
<b>Lista de tabelas</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xvi</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>1</b>
1. Receptor <i>N</i> -metil-D-aspartato – NMDA .....	2
2. Poliaminas .....	5
2.1. Estrutura e metabolismo .....	5
2.2. Funções .....	9
2.3. Poliaminas x Radicais Livres .....	10
2.4. Poliaminas x Receptor NMDA .....	17
3. Neurotoxinas .....	20
3.1. Ácido Quinolínico .....	20
3.2. Nitroprussiato de Sódio .....	22
3.3. Ferro .....	23
<b>Objetivos</b> .....	<b>26</b>
<b>Artigo</b> .....	<b>29</b>



<b>Anexo .....</b>	<b>51</b>
<b>Discussão .....</b>	<b>56</b>
<b>Conclusão .....</b>	<b>66</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>69</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

AQ –	Ácido quinolínico
ERO –	Espécies reativas de oxigênio
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> –	Peróxido de hidrogênio
L-NAME –	N-nitro-L-arginina metil éster
L-NARG –	N $\omega$ -nitro-L-arginina
$\mu$ M –	Micromolar
mM –	Milimolar
nM –	Nanomolar
NADPH –	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido)
NMDA –	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato
NO –	Óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> –	Ânion superóxido
•OH –	Hidroxil
ONOO <sup>-</sup> –	Peroxinitrito
ONS –	Óxido nítrico sintase
RO• –	Alcoxil
ROO• –	Peroxil
SAM-D –	S-adenosil-metionina descarboxilada
SOD –	Superóxido dismutase
SNC –	Sistema Nervoso Central
TBARS –	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Representação esquemática do receptor NMDA .....	4
<b>Figura 2</b> – Estrutura química das poliaminas .....	5
<b>Figura 3</b> – Biossíntese e ciclo de interconversão das poliaminas .....	7
<b>Figura 4</b> – Detalhes da reação da espermina com o radical $\cdot\text{OH}$ .....	12
<b>Figura 5</b> – Prováveis rotas antioxidantes da espermina .....	15
<b>Figura 6</b> – Complexo do $\text{Cu}^{2+}$ e espermina .....	16
<b>Figura 7</b> – Mecanismo de liberação do $\text{NO}\cdot$ pelo nitroprussiato de sódio .....	22
<b>Figura 8</b> – Efeito das poliaminas sobre a produção de TBARS espontânea e induzida pelo AQ .....	55
<b>Figura 9</b> – Efeito da arcaína sobre a produção de TBARS espontânea e induzida pelo AQ na ausência e na presença das poliaminas .....	56
<b>Figura 10</b> – Cadeia respiratória mitocondrial e a geração do radical $\text{O}_2\cdot^-$ .....	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Poliaminas nos tecidos de ratos adultos .....	8
---	---

## RESUMO

**Titulo:** Efeito das poliaminas sobre a lipoperoxidação induzida por neurotoxinas em cérebro de ratos

**Aluno:** Nádia Aléssio Velloso Bellé

**Orientador(a):** Maribel Antonello Rubin

**Co-orientador:** João Batista Teixeira da Rocha

As poliaminas, entre suas variadas funções, podem atuar também como antioxidantes bem como removedoras de radicais livres. O ácido quinolínico, nitroprussiato de sódio e ferro estimulam a produção de radicais livres e conseqüente lipoperoxidação, através de mecanismos variados. No presente estudo nós investigamos os efeitos das poliaminas, espermina e espermidina, sobre a produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) – um indicativo de lipoperoxidação – induzida por ácido quinolínico, nitroprussiato de sódio, sistema ferro/EDTA e ferro livre em encéfalos de ratos. Espermina e espermidina, nas menores concentrações testadas (nM), não tiveram efeito significativo sobre a lipoperoxidação basal ou sobre a lipoperoxidação induzida por ácido quinolínico. No entanto ambas poliaminas, a concentrações micromolares, inibiram a produção de TBARS induzida por ácido quinolínico; sendo que a espermina foi mais eficaz que a espermidina. Espermina e espermidina também inibiram a lipoperoxidação induzida por nitroprussiato de sódio, ferro/EDTA e ferro livre; contudo obtiveram um modesto efeito e somente em altas concentrações (mM). Em adição, ambas poliaminas tiveram seu efeito inibitório acentuado pelo

MK-801 quando a lipoperoxidação foi induzida pelo ácido quinolínico. Já a arcaína não alterou o efeito inibitório das poliaminas. Os presentes achados sugerem que os efeitos observados para as poliaminas não estão relacionados à sua atividade sobre o receptor NMDA mas com suas propriedades removedoras de radicais livres.

## ABSTRACT

**Title:** Effect of polyamines on lipid peroxidation induced by neurotoxins in rat brain.

**Student:** Nádia Aléssio Velloso Bellé

**Adviser:** Maribel Antonello Rubin

**Co-Adviser:** João Batista Teixeira da Rocha

Polyamines, among other functions, are considered to act as a free radical scavenger and antioxidant. The quinolinic acid, sodium nitroprusside and iron stimulate production of free radicals and consequent lipid peroxidation, by diverse mechanisms. In the present study we investigated the effects of polyamines, spermine and spermidine, on thiobarbituric reactive species (TBARS) production – an index of lipid peroxidation – induced by quinolinic acid, sodium nitroprusside, iron/EDTA system and free iron in rat brain. Spermine and spermidine, in the minor concentrations tested (nM), did not had a significant effect on basal lipid peroxidation or on quinolinic acid-induced lipid peroxidation. Nevertheless both polyamines, in micromolar concentrations, inhibited quinolinic acid-induced TBARS production; being spermine more efficient than spermidine. Spermine and spermidine also inhibited sodium nitroprusside-, iron/EDTA- and free iron-induced lipid peroxidation, but had a modest effect and only in high concentrations (mM). In addition, in the presence of MK-801, quinolinic acid-induced lipid peroxidation was considerably more inhibited by polyamines. Arcaine did not affect the reducer effect of polyamines. The present findings suggest that the observed effects of

polyamines are not related to the activation of NMDA receptor but with their free radical scavenger properties.



---

## I. INTRODUÇÃO

## 1. RECEPTOR N-METIL-D-ASPARTATO – NMDA

O receptor NMDA é um complexo formado por receptor e canal (COTMAN *et al.*, 1995) e sua ativação resulta no influxo de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e sódio ( $\text{Na}^+$ ) bem como no efluxo de potássio ( $\text{K}^+$ ), ocasionando a despolarização celular (SCATTON, 1993; OZAWA *et al.*, 1998). Em potenciais normais de repouso, contudo, o canal torna-se bloqueado por íons magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), e tal “bloqueio de magnésio” impede a livre passagem de outros íons através do canal NMDA. O  $\text{Mg}^{2+}$  sai do poro somente quando a membrana está despolarizada. Portanto, correntes iônicas de entrada através do canal NMDA são dependentes de voltagem, além de serem ativadas por transmissor (BEAR *et al.*, 2002). Este bloqueio voltagem-dependente do canal do NMDA por  $\text{Mg}^{2+}$  pode ser visto como um mecanismo protetor intrínseco contra a entrada excessiva de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula e subsequente toxicidade neuronal (SCATTON *et al.*, 1991).

Sempre que neurônios não conseguem gerar ATP suficiente para manter as suas bombas iônicas funcionando ativamente, como acontece em condições de hipóxia ou isquemia, membranas despolarizam e  $\text{Ca}^{2+}$  vaza para dentro da célula (SCATTON *et al.*, 1991; BEAR *et al.*, 2002). A entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  ocasiona a liberação de glutamato na fenda sináptica. Quando este atinge altas concentrações, ele mata os neurônios por superexcitação, um processo denominado excitotoxicidade. O glutamato ativa seus diversos tipos de receptores permitindo o influxo de quantidades excessivas de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  para o interior do neurônio. O receptor NMDA é um agente crítico na excitotoxicidade, pois esse

canal é a principal via de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula. Dano ou morte neuronal ocorrem devido ao inchamento resultante da captação de água e estimulação, pelo  $\text{Ca}^{2+}$ , de enzimas intracelulares que degradam proteínas, lipídios e ácidos nucléicos. Os neurônios literalmente se autodigerem (CHOI, 1988; BEAR *et al.*, 2002).

A excitotoxicidade tem sido implicada recentemente em diversas doenças neurodegenerativas progressivas em humanos, tais como a esclerose amiotrófica lateral (EAL, também conhecida como doença de Lou Gehrig) e a doença de Alzheimer (ULAS *et al.*, 1992; NICOLETTI *et al.*, 1996; BEAR *et al.*, 2002). Também tem sido relatado que a excitotoxicidade está envolvida na patofisiologia de injúria cerebral aguda, doenças neurodegenerativas crônicas, doença de Parkinson e depressão (CHOI, 1988; LIPTON & ROSENBERG, 1994). A excitotoxicidade induzida pelos receptores NMDA também parece ter uma participação na neurodegeneração associada com injúria hipóxia/reperfusão, trauma craniano e alcoolismo (DIEMER *et al.*, 1993; LOVINGER, 1993).

O receptor NMDA é modulado por vários compostos tanto endógenos quanto exógenos, os quais se ligam em sítios de ligação específicos associados a este receptor. Dentre estes, existem sítios de ligação para agonistas e antagonistas competitivos, sítio onde se liga o  $\text{Mg}^{2+}$  (produzindo bloqueio voltagem-dependente do canal), sítio modulatório para a glicina (co-agonista do receptor NMDA), bem como sítios de ligação para poliaminas (RANSOM & STEC, 1988; SINGH *et al.*, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1991). Como já dito, estes sítios são específicos e distribuem-se em locais distintos no receptor NMDA, conforme mostra a figura 1 (SCATTON, 1993).

A estrutura do receptor NMDA, assim como dos demais receptores ionotrópicos, é pentamérica e consiste de várias subunidades com diferentes massas moleculares, as quais variam de 33 a 67 kD (MAYER *et al.*, 1992).

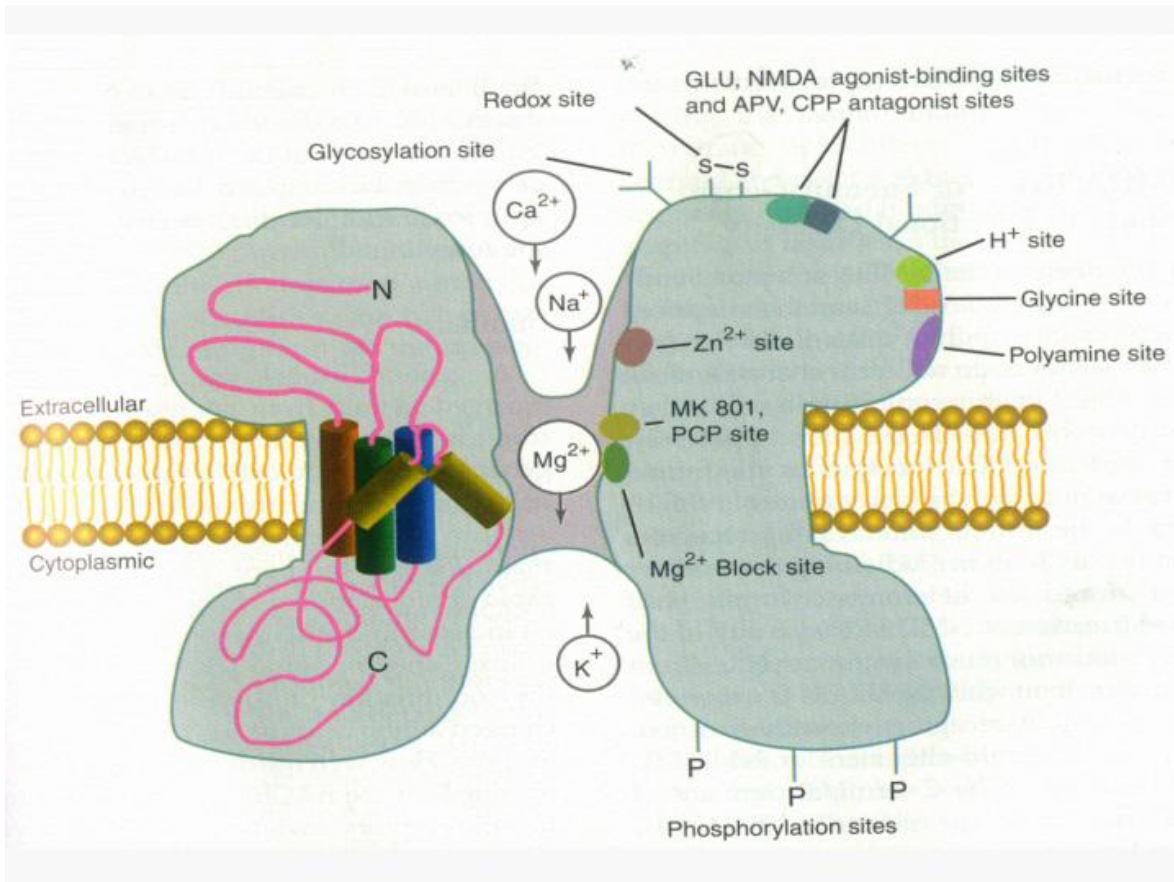


FIGURA 1. Representação esquemática do receptor NMDA (adaptado de ZIGMOND *et al.*, 1999).

## 2. POLIAMINAS

### 2.1. ESTRUTURA E METABOLISMO

As poliaminas são aminas alifáticas simples consistindo de uma, duas ou três cadeias carbonadas flexíveis, as quais são conectadas por átomos de nitrogênio. Elas carregam grupos amino primários em cada extremidade da cadeia, como mostra a figura 2 (CARTER, 1994).

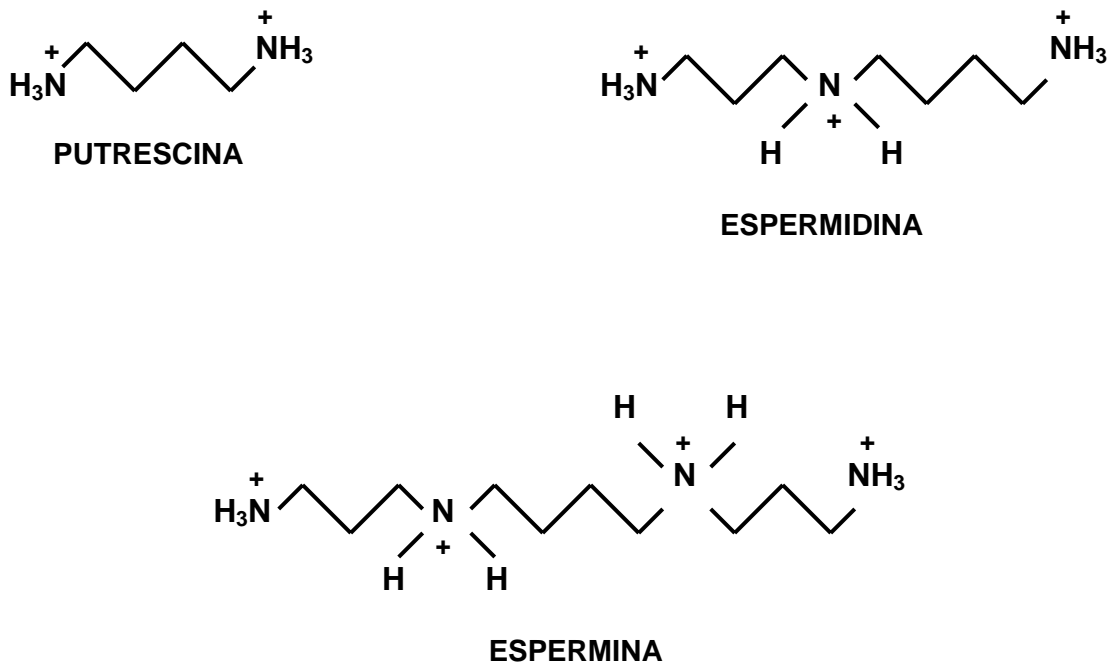


FIGURA 2. Estrutura química das poliaminas (adaptado de WILLIAMS, 1997).

Estes grupos amino das poliaminas conferem um caráter fortemente básico às mesmas. Em pH fisiológico, elas encontram-se completamente protonadas (como mostra a figura 2), resultando em cátions orgânicos de baixo peso

molecular. Esta qualidade policatiônica tem atraído a atenção de pesquisadores e conduzido a hipóteses de que as poliaminas possam afetar sistemas fisiológicos por se ligarem em sítios aniônicos, como aqueles associados aos ácidos nucléicos e aos fosfolipídios de membrana (JOHNSON, 1996).

As poliaminas foram descobertas em 1678 por van Leeuwenhoek, o qual observou fosfato de espermina cristalizado em sêmen frio e seco (TABOR & TABOR, 1984; CARTER, 1994; COHEN, 1998). As poliaminas putrescina, espermidina e espermina são encontradas em todas as células eucarióticas, incluindo células do sistema nervoso de vertebrados.

As poliaminas endógenas são produtos do metabolismo da ornitina, um aminoácido intermediário do ciclo da uréia. A ornitina é formada a partir da clivagem hidrolítica do aminoácido arginina em uma reação catalisada pela arginase (Fig. 3) (SEILER, 1981; SEILER, 1994; CARTER, 1994). No encéfalo de vertebrados, a ornitina formada é então descarboxilada por ação da enzima ornitina descarboxilase dando origem à putrescina, precursora da espermidina e da espermina. A partir daí, a enzima espermidina sintase transfere um grupo aminopropil da S-adenosil-metionina descarboxilada (SAM-D) para a putrescina, dando origem à espermidina. A espermidina formada pode vir a sofrer ação da enzima espermina sintase, a qual transfere um segundo grupo aminopropil de outra molécula de SAM-D para a espermidina originando a espermina (TABOR & TABOR, 1984; SEILER, 1994). Esta rota de síntese de poliaminas é interconvertível, ou seja, a espermina pode ser convertida em espermidina e esta em putrescina. O primeiro passo desta interconversão é a acetilação da espermina na posição N1. Após este passo, a poliamina acetilada sofre quebra oxidativa,

liberando os grupos aminopropil provenientes da SAM-D por ação da enzima poliamina oxidase (SEILER, 1994).

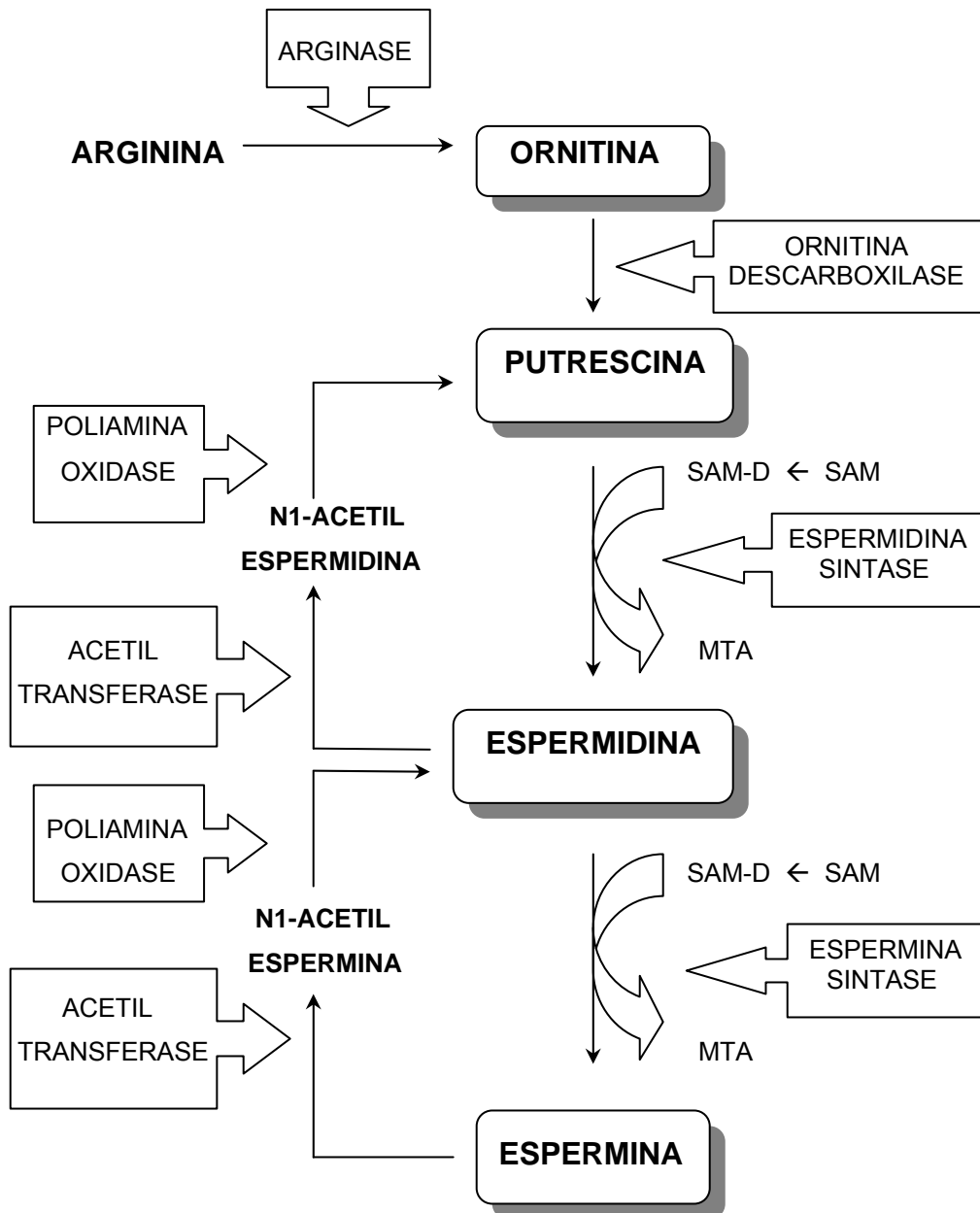


FIGURA 3. Biossíntese e ciclo de interconversão das poliaminas (adaptado de CARTER, 1994 e ROCK & MACDONALD, 1995).

Na maioria dos tecidos, as concentrações de poliaminas são de magnitude comparáveis. Contudo, as glândulas exócrinas (pâncreas, próstata) contém grandes depósitos de espermidina; a próstata também deposita grandes quantidades de putrescina e espermina, conforme mostra a tabela 1.

**Tabela 1. Poliaminas nos tecidos de ratos adultos**

Tecido	Putrescina (nmol g <sup>-1</sup> )	Espermidina (nmol g <sup>-1</sup> )	Espermina (nmol g <sup>-1</sup> )
Encéfalo	10 ± 2	447 ± 35	387 ± 51
Fígado	10 ± 1	1040 ± 70	800 ± 60
Rim	18 ± 1	520 ± 90	840 ± 50
Músculo esquelético	5 ± 1	70 ± 9	240 ± 10
Coração	8 ± 2	367 ± 23	373 ± 70
Pulmão	25 ± 7	557 ± 90	570 ± 124
Baço	44 ± 17	1550 ± 80	1480 ± 150
Pâncreas	28 ± 3	5100 ± 190	730 ± 110
Próstata	225 ± 50	8890 ± 1530	5670 ± 890

Valores expressos como média ± desvio padrão.

Dados tirados de SEILER *et al.*, 1985; MARCHANT & BLANKENSHIP, 1983; WAGNER *et al.*, 1984.



## 2.2. FUNÇÕES

Apesar de terem sido descobertas a mais de 300 anos, estudos acerca das propriedades e funções das poliaminas estão sendo desenvolvidos somente nas últimas três décadas. Durante este período, uma impressionante quantidade de dados foram acumulados indicando algumas funções destes compostos em vários processos celulares. Sabe-se que as poliaminas estão envolvidas nos processos de crescimento e diferenciação celulares por ativação da síntese do RNA e da síntese protéica (CAMPBELL *et al.*, 1978; TABOR & TABOR, 1984; GRILO, 1985). Elas também participam de outros processos tais como regulação da expressão gênica (CELANO *et al.*, 1989), morte celular programada ou apoptose (HA *et al.*, 1997), atividade antiinflamatória (LOVAAS & CARLIN, 1991) e proteção contra danos causados por radiações (GERNER *et al.*, 1988). Espermina e espermidina foram consideradas agentes antimutagênicos, uma vez que elas reduziram a mutabilidade espontânea de várias bactérias (CLARKE & SHANKEL, 1975) e de linfócitos sangüíneos periféricos cultivados expostos à irradiação gama (NANDAN, 1988). Além disso, estudos recentes mostram que a espermidina, quando injetada tanto no hipocampo quanto na amígdala, melhora a memória de ratos no teste de esquiva inibitória (RUBIN *et al.*, 2000; RUBIN *et al.*, 2001).

Além disso, as poliaminas promovem a inibição da permeabilidade de membrana da mitocôndria (LAPIDUS & SOKOLOVE, 1992) e ainda previnem a perda do controle respiratório bem como a restauração da fosforilação oxidativa em mitocôndrias envelhecidas (SCHUBER, 1989).

Elas ainda estão envolvidas na regulação da atividade da óxido nítrico sintase, inibindo a mesma. A óxido nítrico sintase é a enzima que converte o

substrato arginina, através da oxidação do seu nitrogênio guanidino, em óxido nítrico. Esta reação é dependente de NADPH e  $Ca^{2+}$ /calmodulina. As poliaminas, com seus grupamentos amino carregados positivamente, podem interagir com o NADPH interferindo na transferência de elétrons para o  $O_2$  durante a oxidação da arginina; além disto, elas também podem interagir com o sítio de ligação do substrato nesta enzima, bloqueando, desta maneira, a síntese de óxido nítrico (HU *et al.*, 1994).

### **2.3. POLIAMINAS x RADICAIS LIVRES**

Os radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ERO) são formados por clivagem homolítica de uma ligação covalente na molécula, seja pela adição de um elétron ou pela retirada de um átomo de hidrogênio por outro radical. Portanto, os radicais livres possuem um elétron desemparelhado, mas são comumente neutros e centrados em um átomo de oxigênio (PACKER *et al.*, 1996; PUNCHARD & KELLY, 1996).

Eles podem ser gerados em processos celulares normais, atuando como moléculas regulatórias em processos bioquímicos – linfócitos e fibroblastos geram constantemente pequenas quantidades do radical superóxido como regulador do crescimento (MEIER & SIES, 1990; BURDON, 1995). Este radical também pode ser gerado como parte de uma cascata de eventos da resposta tecidual aos microorganismos invasores ou material exógeno através da ação antimicrobiana de células fagocíticas (CROSS, 1990; BABIOR, 2000). Contudo, os radicais livres e o estresse oxidativo gerado por estas espécies estão sendo cada vez mais

associados com a patofisiologia de muitas doenças (RICE-EVANS, 1986; RICE-EVANS, 1989; PACKER *et al.*, 1996).

As principais ERO que estão tipicamente vinculadas ao estresse oxidativo são o radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxil ( $^{\bullet}OH$ ), óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). São espécies eletrofílicas com reatividade variável e geradas por uma variedade de processos celulares, podendo atacar uma diversidade de biomoléculas alvo e causando, conseqüentemente, ação tóxica. Estes alvos incluem proteínas, bases do DNA e RNA e o colesterol nos complexos lipoprotéicos. Os ácidos graxos poliinsaturados presentes nos fosfolipídios constituintes de membranas biológicas são particularmente suscetíveis ao dano oxidativo causado por radicais livres (JOSEPHY, 1997; TIMBREL, 2000). A lipoperoxidação descontrolada é um processo tóxico que resulta na deterioração das membranas biológicas e na formação de certos subprodutos com propriedades citotóxicas. Alguns destes subprodutos, tal como o malondialdeído (usado como marcador químico da lipoperoxidação) ou os 4-hidroxiálquenos (4-hidroxi nonenal) e 2-álquenos (acroleína e crotonaldeído) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; TIMBREL, 2000), podem ocasionar morte celular. A ocorrência de um dano biológico é dependente de um desequilíbrio entre a produção das ERO e a atividade das defesas antioxidantes (HALLIWELL, 1992; DAWSON & DAWSON, 1996).

Dentre as variadas funções das poliaminas, uma de suas importantes propriedades é a capacidade de remoção de radicais livres (DROLET *et al.*, 1986; KHAN *et al.*, 1992a; 1992b; HA *et al.*, 1998). HA e colaboradores (1998)

mostraram que a espermina atua diretamente como removedora de radicais livres, podendo reagir com o radical  $\cdot\text{OH}$  (DROLET *et al.*, 1986; HA *et al.*, 1998). Contudo, esta reação pode resultar na formação de acroleína (Fig. 4), um subproduto tóxico o qual está envolvido com o aumento da injúria isquêmica (UCHIDA, 1999).

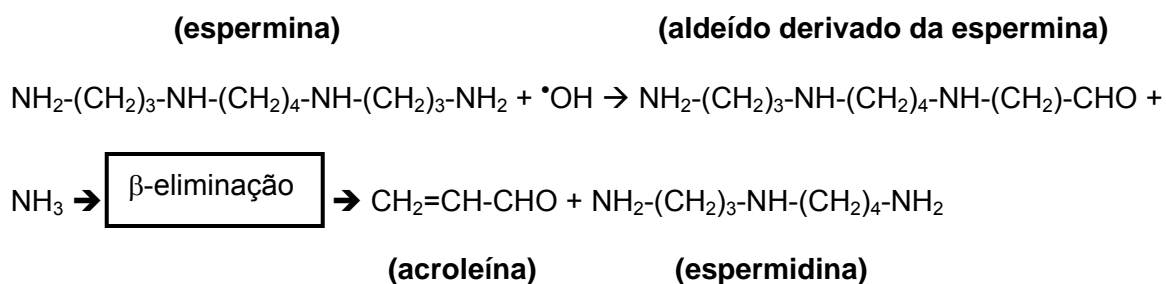


FIGURA 4. Detalhes da reação da espermina com o radical  $\cdot\text{OH}$  (adaptado de ADIBHATLA *et al.*, 2002).

Espermina e espermidina também protegem o DNA contra a toxicidade induzida pelo oxigênio singlet (KHAN *et al.*, 1992a; 1992b) e podem ainda reduzir os níveis do radical  $\text{O}_2^{\cdot-}$  gerado pela reação da xantina oxidase. Os efeitos inibitórios das poliaminas são dependentes de concentração e a magnitude de inibição parece estar relacionada ao número de grupamentos amino nas mesmas. Por exemplo, a espermina e a espermidina, as quais com quatro e três grupamentos amino respectivamente, são removedoras mais efetivas do radical  $\text{O}_2^{\cdot-}$  do que a putrescina (DROLET *et al.*, 1986).

Além de serem efetivas removedoras de radicais livres, as poliaminas ainda exibem potencial antioxidante (KITADA *et al.*, 1979; TADOLINI, 1988; LOVAAS &

CARLIN, 1991; LOVAAS, 1997). Contudo, o mecanismo preciso pelo qual estas aminas exercem esta função ainda não está muito bem esclarecido. KITADA e colaboradores (1979) sugerem que sua capacidade antioxidante esteja relacionada à habilidade das poliaminas de interagir com os fosfolipídios, carregados negativamente, e estabilizar as membranas celulares. Esta suposição tem sido respaldada, pelo menos em parte, pela observação de que altas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ , as quais competem com as poliaminas pelas cargas dos fosfolipídios de membrana, previnem ou reverterem parcialmente o efeito das poliaminas (APELBAUM *et al.*, 1981).

No entanto, LOVAAS & CARLIN (1991) sugerem que o mecanismo antioxidante da espermina seja um dos seguintes:

- inibição da geração ou do transporte dos radicais  $\text{O}_2^{\bullet-}$  gerados por granulócitos estimulados
- inibição da geração do radical  $\bullet\text{OH}$  por formar um quelato não-reativo com o ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ).

A primeira sugestão é dependente da proporção e magnitude do transporte de poliaminas para dentro das células. Uma vez dentro da célula, a espermina pode inibir a geração dos radicais  $\text{O}_2^{\bullet-}$  pelos granulócitos seja pela inibição da explosão respiratória ou por interferir em algumas das reações geradoras dos radicais  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .

A segunda sugestão, por outro lado, aponta a espermina como um composto capaz de formar um quelato com o  $\text{Fe}^{2+}$ . Conforme observado por Fenton em

1894, sais de  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$  reagem com peróxido de hidrogênio, como mostra a reação a seguir:



O resultado desta reação é a formação do radical  $\cdot\text{OH}$ , o radical mais reativo e potente, capaz de reagir com quase todas as moléculas nas células (FRIDOVICH, 1986). Experimentos com lipossomas e com despolimerização do ácido hialurônico indicam que a espermina age como um quelante de  $\text{Fe}^{2+}$ . Foi observado que a espermina, assim como a desferroxamina, inibe as ações deste metal. Assim sendo, é possível que esta poliamina forme um quelato não reativo com o  $\text{Fe}^{2+}$  e, desse modo, previna a geração dos destrutivos radicais hidroxil (LOVAAS & CARLIN, 1991).

Em concordância com estes achados, TADOLINI (1988), defende a hipótese de que a inibição da lipoperoxidação causada pelas poliaminas seja devido à sua habilidade de formar um complexo ternário com as cabeças polares dos fosfolípidios e com o  $\text{Fe}^{3+}$ , impedindo ou reduzindo a oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$ . A redução da oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  resultaria em um decréscimo da geração de ERO com conseqüente redução da lipoperoxidação.

ADIBHATLA e colaboradores (2002) mostram que os níveis de espermina e espermidina são reduzidos na ocorrência de isquemia cerebral focal transitória e isquemia cerebral focal permanente em ratos. A perda de espermina e espermidina, particularmente espermina, pode acarretar várias conseqüências que contribuem para a injúria isquêmica, incluindo desestabilização da cromatina, redução da capacidade de tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial e aumento da

susceptibilidade ao estresse oxidativo. A isquemia resulta na geração de espécies reativas de oxigênio incluindo o radical  $\cdot\text{OH}$ , que contribui para a injúria isquêmica. O  $\text{Fe}^{2+}$  liberado da ferritina durante a isquemia promove a formação de  $\cdot\text{OH}$  via reação de Fenton. Tem sido sugerido que a espermina aja como um potente antioxidante ou por remoção dos radicais de oxigênio ou por quelatação do  $\text{Fe}^{2+}$  que catalisa a geração de  $\cdot\text{OH}$ , conforme figura 5, de maneira semelhante à hipótese sugerida por LOVAAS & CARLIN (1991).



FIGURA 5. Prováveis rotas químicas da espermina (adaptado de ADIBHATLA *et al.*, 2002).

No entanto, foi demonstrado que o tratamento com espermina reduz significativamente o volume do infarto em isquemia cerebral focal transitória (COERT *et al.*, 2000), um resultado que contradiz a produção de acroleína como consequência da reação da espermina com o radical  $\cdot\text{OH}$  (mecanismo 1 da figura

5). Por outro lado, a quelação do  $\text{Fe}^{2+}$  pela espermina pode prevenir a formação do radical  $\cdot\text{OH}$  sem a formação de subprodutos tóxicos.

Sabe-se que a espermina é capaz de formar quelato com o cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), e a estrutura deste complexo já foi delineada (LOVAAS & CARLIN, 1991), conforme mostra a figura 6.

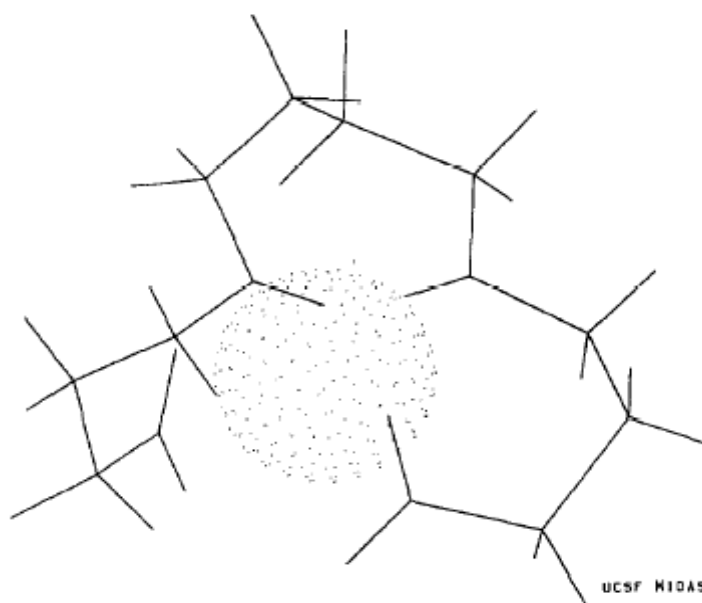


FIGURA 6. Complexo do  $\text{Cu}^{2+}$  e espermina. A figura é baseada na cristalografia de BOGGS & DONOHUE, 1975.

Assim como ocorre com o  $\text{Cu}^{2+}$ , a estrutura do quelato espermina- $\text{Fe}^{2+}$  deve ser semelhante àquela do complexo espermina- $\text{Cu}^{2+}$  (LOVAAS & CARLIN, 1991). É concebível que a espermina esteja envolvida em ambas as rotas (conforme figura 5), entretanto, as constantes-proporcionais para reações com o radical  $\cdot\text{OH}$  indicam que a espermina não reage significativamente com o  $\cdot\text{OH}$  e que existem removedores de radicais livres muito mais eficientes *in vivo* (LOVAAS, 1997). Este



argumento favorece o mecanismo pelo qual a espermina forme um quelato com o  $\text{Fe}^{2+}$ , sendo esta uma sugestão de seu mecanismo antioxidante (mecanismo 2 da figura 5).

Em um modelo de isquemia cerebral, FARBISZEWSKY e colaboradores (1995) mostraram que a espermina reverteu significativamente o decréscimo da atividade da superóxido dismutase (SOD) no córtex, ou seja, a espermina demonstrou ter efeito protetor sobre uma enzima antioxidante. Neste estudo, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um indicador de lipoperoxidação, foi reduzido pela administração de espermina em ratos (5 mg/kg, i.v.). No entanto, LOVAAS & CARLIN (1991) mostram que a espermina *per se* não mimetiza o efeito da SOD. Eles sugerem que seja possível que o complexo  $\text{Fe}^{2+}$ -espermina tenha uma atividade mimética da SOD. Tal atividade já foi demonstrada anteriormente com vários complexos metálicos, em particular com complexos de  $\text{Cu}^{2+}$  (KENSLETER *et al.*, 1983; BEYER & FRIDOVICH, 1989).

#### **2.4. POLIAMINAS x RECEPTOR NMDA**

A despeito das abundantes investigações das poliaminas, sua função fisiológica exata no sistema nervoso ainda é obscura. Elas podem atuar, no sistema nervoso central, como neurotransmissores e/ou neuromoduladores (WILLIAMS *et al.*, 1991; ROCK & MACDONALD, 1992; CARTER, 1994). Embora as poliaminas interajam com canais de cálcio (HERMAN *et al.*, 1993) a maioria dos estudos têm focalizado as interações destas aminas com o receptor NMDA.

A ocorrência simultânea de receptores NMDA e elevados níveis de poliaminas durante o desenvolvimento neonatal sugerem a possibilidade de que

estas aminas, atuando nos receptores NMDA, possam influenciar no crescimento neuronal, migração e plasticidade sináptica (JOHNSON, 1996).

Elas são potentes reguladoras do receptor glutamatérgico NMDA, onde existem pelo menos três sítios distintos de ligação para poliaminas (SINGH *et al.*, 1990; YONEDA & OGITA, 1991; JOHNSON, 1996; WORTHEN *et al.*, 2001), sendo esta variedade de sítios responsáveis pela sua complexa atividade modulatória. As poliaminas exibem um comportamento interessante sobre o receptor NMDA: a curva concentração-efeito para a espermina e espermidina é bifásica, sugerindo dois efeitos distintos das poliaminas, presumivelmente mediado pela variedade de sítios de reconhecimentos distintos associados a este receptor. Em baixas concentrações, a espermina aumenta a condutância do receptor NMDA por aumentar a frequência de abertura do canal. No entanto, em altas concentrações ela induz uma redução voltagem-dependente na condutância do canal e reduz o tempo médio de abertura do mesmo (ROCK & MACDONALD, 1992).

É previsto que antagonistas do sítio das poliaminas não tenham nenhum efeito ou efeito mínimo sobre a condutância do receptor NMDA. Contudo, em seu estudo, ROCK & MACDONALD (1992) relatam que os três antagonistas testados (arcaína, dietilenotriamina e putrescina) reduziram a condutância do receptor NMDA, sempre na ausência de agonistas no sítio das poliaminas. Estas aminas também podem inibir a condutância deste receptor quando em altas concentrações; assim sendo, elas também podem agir como antagonistas do receptor NMDA.

Estudos eletrofisiológicos associados a trabalhos utilizando receptores recombinantes têm demonstrado que as poliaminas não ativam diretamente os receptores NMDA; elas agem potencializando ou inibindo as respostas mediadas pelo glutamato, seu principal agonista. O efeito potencializador das poliaminas pode ser subdividido em:

- estimulação glicina-independente: na qual as poliaminas aumentam as correntes induzidas por glutamato na presença de concentrações saturantes de glicina,
- estimulação glicina-dependente: resultando em aumento da afinidade do receptor pela glicina.

Por sua vez, o efeito inibitório das poliaminas também pode ser subdividido em:

- inibição do canal voltagem-dependente: redução da condutância do canal seja devido a resíduos carregados presentes na entrada do canal ou devido ao rápido bloqueio do mesmo em um sítio dentro do poro (provavelmente envolvendo íons  $Mg^{2+}$ ),
- inibição da afinidade do receptor pelo glutamato (JOHNSON, 1996).

Como já mencionado anteriormente, a estrutura do receptor NMDA é pentamérica e consiste de várias subunidades (MAYER *et al.*, 1992). Em receptores NMDA recombinantes, os efeitos das poliaminas são controlados pela composição das subunidades no receptor, o que pode ajudar a explicar a confusão, e efeitos aparentemente contraditórios, das poliaminas em receptores NMDA, onde a estimulação ou inibição variam amplamente em cultura de

neurônios. Portanto, sugere-se que os efeitos modulatórios das poliaminas (estimulatório ou inibitório) dependa da composição das subunidades no receptor NMDA associado à variedade de sítios de ligação para estas aminas neste receptor (JOHNSON, 1996).

### **3. NEUROTOXINAS**

#### **3.1. ÁCIDO QUINOLÍNICO**

O ácido quinolínico (AQ) ou ácido 2,3-piridino dicarboxílico é sintetizado a partir do aminoácido L-triptofano por ação da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (FOSTER *et al.*, 1985). Ele é um composto formado por um anel aromático piridínico e duas carboxilas, sendo estruturalmente análogo ao glutamato e ao aspartato (SCHWARCZ *et al.*, 1983; SHARMA *et al.*, 1989). O AQ é reconhecido farmacologicamente como um agonista direto dos receptores NMDA e suas propriedades estruturais são um fator importante para sua atividade neste receptor (GARTHWAITE & GARTHWAITE, 1987).

Este ácido é um metabólito neuroativo encontrado em encéfalos de ratos e humanos. Uma ampla variedade de estudos experimentais têm examinado os efeitos biológicos e patofisiológicos do AQ no SNC e estudos clínicos têm demonstrado elevação deste ácido no tecido nervoso ou no fluido cerebrospinal de pacientes com várias desordens neurológicas degenerativas, infecciosas ou inflamatórias (HEYES *et al.*, 1990; HEYES, 1996; MAEDA *et al.*, 1997).

Os efeitos neurotóxicos desta excitotoxina estão bem estabelecidos: a administração de quinolinato induz convulsões em várias espécies de mamíferos

(LAPIN, 1981; LAPIN *et al.*, 1998) e quando injetado no estriado e hipocampo de ratos provoca neurodegeneração (FOSTER *et al.*, 1984). Relatos prévios descrevem a capacidade do AQ em provocar lipoperoxidação em tecido nervoso de ratos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (RÍOS & SANTAMARÍA, 1991; SANTAMARÍA & RÍOS, 1993; ROSSATO *et al.*, 2002a; 2002b). Além disto, STÍPEK e colaboradores (1997) descrevem que o efeito do AQ na lipoperoxidação em encéfalos de ratos *in vitro* é dependente de íons  $Fe^{2+}$ . A neurotoxicidade estriatal induzida por este ácido é mediada, nos estágios iniciais, via estresse oxidativo, afetando primeiramente sistemas de defesa antioxidantes. Estes achados sugerem o envolvimento de radicais livres e estresse oxidativo no modelo de toxicidade desencadeado pelo AQ no sistema nervoso (RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.*, 2000).

O mecanismo em que se baseia a neurotoxicidade induzida por AQ parece envolver a superestimulação dos receptores NMDA. Visto que o AQ não é prontamente metabolizado na fenda sináptica, ele estimula o receptor NMDA por longos períodos. Esta estimulação prolongada resulta na abertura dos canais deste receptor, entrada massiva de íons  $Ca^{2+}$  e posterior ativação de uma série de processos intracelulares dependentes de  $Ca^{2+}$ , incluindo produção de radicais livres e lipoperoxidação, conduzindo à dano celular e freqüentemente morte neuronal (STONE & PERKINS, 1981).

A participação dos receptores NMDA na toxicidade mediada pelo AQ é sustentada pelo fato de que o MK-801 bloqueia alterações comportamentais e neuroquímicas bem como a lipoperoxidação induzidas pela administração intraestriatal deste ácido (ZHU *et al.*, 1989; SANTAMARÍA & RÍOS, 1993).

### 3.2. NITROPRUSSIATO DE SÓDIO:

Compostos S-nitrosotióis, como o nitroprussiato de sódio, são considerados instáveis em soluções aquosas. A labilidade destes compostos é devido a sua propensão de passar por uma clivagem homolítica na ligação S-N com liberação de NO (ARNELLE & STAMLER, 1995). O nitroprussiato de sódio ou  $\text{Na}_2(\text{CN})_5\text{FeNO}$  é um doador clássico de NO. Este composto reage primeiramente com grupamentos tióis, formando complexos em que o enxofre é ligado ao nitrogênio. Grupos tiólicos livres atuam como agentes redutores para doar elétrons; esta reação promove a liberação do  $\text{NO}^\bullet$  do nitroprussiato de sódio, conforme figura 7 (MANZONI *et al.*, 1992; LIPTON & STAMLER, 1994).

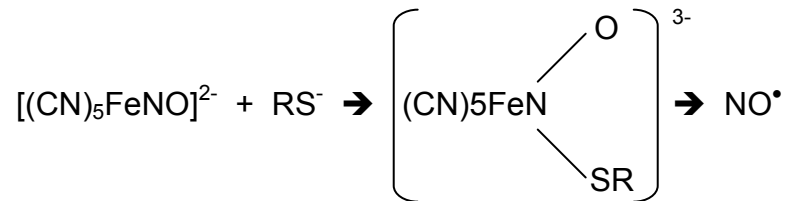


FIGURA 7. Mecanismo de liberação do  $\text{NO}^\bullet$  pelo nitroprussiato de sódio, onde o  $\text{RS}^-$  representa um grupo tiol (adaptado de LIPTON & STAMLER, 1994).

Os efeitos biológicos deste composto têm sido atribuídos unicamente à liberação do  $\text{NO}^\bullet$  (ARNELLE & STAMLER, 1995). O  $\text{NO}^\bullet$  é uma molécula simples, reconhecida como um mensageiro neuronal que está largamente presente no sistema nervoso central e que medeia uma variedade de atividades biológicas (PRAST & PHILIPPOU, 2001; WEISINGER, 2001). Nas células neuronais, a

enzima óxido nítrico sintase- $\text{Ca}^{2+}$  dependente alcança altos níveis durante os estágios iniciais do processo de diferenciação na retina e em áreas cerebrais (IENTILE *et al.*, 1996). Assim, o  $\text{NO}^{\bullet}$  produzido pela ativação dos receptores NMDA pode ser importante para processos em que se baseiam a diferenciação neuronal tais como liberação de neurotransmissores e plasticidade sináptica e no processamento de estímulos sensoriais (SHIBUKI & OKADA, 1991).

Apesar disto, existe um número cada vez maior de estudos recentes concernentes ao papel do  $\text{NO}^{\bullet}$  na patofisiologia de desordens tais como doença de Alzheimer e de Parkinson, derrame, trauma, convulsões, epilepsia, esclerose múltipla, etc. (BOLANOS & ALMEIDA, 1999; CASTILL *et al.*, 2000). Sabe-se que o  $\text{NO}^{\bullet}$  é um radical livre com meia-vida curta. Embora ele possa agir independentemente, o  $\text{NO}^{\bullet}$  também pode causar dano neuronal em cooperação com outras ERO (RICE-EVANS & BURDON, 1993). A toxicidade do  $\text{NO}^{\bullet}$  é grandemente aumentada quando este combina-se com o radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  para gerar o  $\text{ONOO}^-$  (HUIE & PADMAJA, 1993; PRYOR & SQUADRITO, 1995). A protonação transforma o  $\text{ONOO}^-$  em um poderoso oxidante ( $\text{HOONO}$ ) capaz de danificar proteínas, lipídios, membranas intactas e DNA. Em adição, a ativação dos receptores NMDA aumenta a geração de  $\text{NO}^{\bullet}$  (GARTHWAITE *et al.*, 1989; FAGE *et al.*, 1992).

### **3.3. FERRO**

O ferro livre, bem como seus complexos, são capazes de estimular a lipoperoxidação nas células (GOGVADZE *et al.*, 2003). A lipoperoxidação pode ser

iniciada por qualquer radical livre primário que tenha reatividade suficiente para extrair um átomo de hidrogênio de um grupo metileno reativo de um ácido graxo insaturado. Na primeira fase do processo de lipoperoxidação, as cadeias altamente vulneráveis dos ácidos graxos poliinsaturados são atacadas por radicais livres formando hidroperóxidos lipídicos. Estes hidroperóxidos lipídicos são moléculas razoavelmente estáveis sob condições fisiológicas, mas sua decomposição é catalisada por metais de transição formando radicais alcóxil ( $RO^{\bullet}$ ) e peróxil ( $ROO^{\bullet}$ ). Os radicais  $RO^{\bullet}$  são análogos altamente reativos do radical  $^{\bullet}OH$  e podem propagar as reações da lipoperoxidação (MINOTTI & AUST, 1987; MILLER & AUST, 1989; JANERO, 1990).

A maior parte do ferro corpóreo (65%) está em seu estado divalente na hemoglobina e na mioglobina, estando o restante distribuído entre os sítios de estoque, predominantemente no fígado, baço e medula óssea, ligado à ferritina (uma proteína de baixo peso molecular que armazena ferro disponibilizando-o para a síntese de proteínas e/ou enzimas contendo ferro) ou ligado à transferrina para transporte (RICE-EVANS & BURDON, 1993). Sabe-se que o ferro desempenha um papel crucial na iniciação e propagação da lipoperoxidação (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999) e os radicais  $ROO^{\bullet}$  lipídicos formados durante a modificação lipídica podem reagir com proteínas, deteriorando as funções de enzimas e receptores, podem amplificar a lipoperoxidação e oxidar o colesterol. Contudo, o ferro e as hemoproteínas estão normalmente protegidas *in vivo* de exercer as atividades pró-oxidantes graças à sua compartimentalização dentro de suas localizações funcionais. A questão é, se não há ferro livre, uma vez



que este está compartimentalizado, como se dá a iniciação e propagação da lipoperoxidação?

Traços de metais de transição ou hemoproteínas podem ser redistribuídos ou deslocados de suas localizações funcionais normais durante dano celular. Em certas situações patológicas, o ferro pode ser liberado de seus compartimentos funcionais normais: tem sido demonstrada a mobilização do ferro da ferritina pelo radical superóxido, ascorbato e outros agentes redutores (BIEMOND *et al.*, 1988). Isto pode ocorrer em células endoteliais, as quais contém altos níveis de ferritina, ou na reperfusão pós-isquemia (RICE-EVANS & BURDON, 1993).

Um estudo relata que existe uma relação linear entre a suscetibilidade de várias regiões de encéfalos de ratos em sofrer lipoperoxidação *in vitro* e suas quantidades de ferro endógeno. A lipoperoxidação em homogeneizados de cérebro de ratos aumenta consideravelmente após a adição de íons ferro na presença de ascorbato. Esta lipoperoxidação aumentada pelo sistema ferro/ascorbato é efetivamente inibida por quelantes de ferro tal como a desferroxamina (ZALESKA & FLOYD, 1985).

Desordens relacionando acúmulo de ferro podem causar danos em órgãos vitais. Dessa maneira, agentes capazes de reduzir o excesso de ferro podem ser potencialmente úteis no tratamento de desordens como a hemocromatose, uma doença que resulta da inabilidade do intestino em excretar o ferro supérfluo (LAUFFER, 1992).

---

## **II. OBJETIVOS**

## **II.1. OBJETIVO GERAL**

Investigar a capacidade antioxidante das poliaminas, espermina e espermidina, sobre o aumento da lipoperoxidação induzida por ácido quinolínico, nitroprussiato de sódio, ferro/EDTA complexado e ferro livre em cérebros de ratos Wistar adultos de ambos os sexos.

## **II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar o efeito antioxidante da espermina e da espermidina sobre a lipoperoxidação espontânea, utilizando-se o ensaio de produção de TBARS em homogeneizados de cérebro de ratos;
- Determinar o efeito antioxidante da espermina e da espermidina sobre a lipoperoxidação induzida por ácido quinolínico, nitroprussiato de sódio, ferro/EDTA complexado e ferro livre em homogeneizados de cérebro de ratos, utilizando-se o ensaio de produção de TBARS;
- Avaliar o efeito do antagonista do receptor NMDA, MK-801, e do antagonista do sítio das poliaminas no receptor NMDA, arcaína, sobre a ação das poliaminas, utilizando-se o ensaio de produção de TBARS em homogeneizados de cérebro de ratos;

- Avaliar o efeito da espermina e da espermidina sobre a lipoperoxidação induzida por ácido quinolínico na presença do MK-801 ou na presença da arcaína, utilizando-se o ensaio de produção de TBARS em homogeneizados de cérebro de ratos;

- Sugerir, a partir dos dados obtidos, um provável mecanismo de ação das poliaminas sobre a lipoperoxidação induzida por ácido quinolínico, nitroprussiato de sódio, ferro/EDTA complexado e ferro livre.

---

**III. ARTIGO**

## Research Report

### **POLYAMINES REDUCES LIPID PEROXIDATION INDUCED BY DIFFERENT PRO-OXIDANT AGENTS**

Nádia Aléssio Velloso Bellé, Gerusa Duarte Dalmolin, Graciela Fonini, Maribel  
Antonello Rubin, João Batista Teixeira Rocha\*

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade  
Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS., Brazil, 97105-900

Number of text pages of the whole manuscript: 21 pages

Number of figures: 05 figures

Number of tables: 01 table

Acknowledgements: This study was supported by CNPq (474241/2003-3,  
523761/95-3 and 500096/2003-1), CAPES and FAPERGS (01/1338.9).

\*Corresponding author:

João Batista Teixeira Rocha

Departamento de Química,

Centro de Ciências Naturais e Exatas,

UFSM, 97105900, Santa Maria, RS, Brazil

Fax: +55-55-220-8031

E-mail: jbtrocha@yahoo.com.br

## **Abstract**

Polyamines, among other functions, are considered to act as a free radical scavenger and antioxidant. The quinolinic acid (QA), sodium nitroprusside (SNP) and iron ( $\text{Fe}^{+2}$ ) stimulate production of free radicals and lipid peroxidation. In the present study, we investigated the free radical and/or aldehyde scavenger effects of polyamines spermine and spermidine on thiobarbituric reactive species (TBARS) production induced by QA, SNP,  $\text{Fe}^{+2}$ /EDTA system and free  $\text{Fe}^{2+}$  in rat brain. Spermine and spermidine inhibited QA-induced TBARS production; however spermine was a better antioxidant than spermidine. Spermine also inhibited SNP-,  $\text{Fe}^{+2}$ /EDTA- and free  $\text{Fe}^{2+}$ -induced TBARS production, but had a modest effect. Spermidine in turn, also discreetly inhibited SNP-,  $\text{Fe}^{+2}$ /EDTA- and free  $\text{Fe}^{2+}$ -induced TBARS production. In the presence of MK-801, QA-induced TBARS production was considerably more inhibited by polyamines. In addition, arcaine do not affect the reducer effect of polyamines. The present findings suggest that the observed effects of polyamines are not related to the activation of NMDA receptor but with their antioxidant and free radical scavenger properties.

*Theme:* Disorders of the nervous system

*Topic:* Neurotoxicity

*Keywords:* Polyamines; Scavenger; Free radicals; Antioxidant; Lipid peroxidation.

## 1. Introduction

Free radicals are now accepted as important mediators of tissue injury in several neurodegenerative models [28, 22, 7, 49, 45]. The brain is particularly susceptible to free radical damage because of its high utilization of oxygen and its relatively low concentration of antioxidant enzymes and free radical scavengers. These free radicals may attack membrane lipids, proteins and nucleic acids to cause cell damage or death [37, 38, 24, 25]. During oxidative stress, cell injury can be amplified by reactive compounds that are by-products of oxidative damage including malondialdehyde; 4-hydroxyalkenals and numerous 2-alkenals [17]. Based on the observation of elevated levels of the aldehydes and/or their respective macromolecular adducts, these lipid peroxidation products appear to contribute to the etiology of a number of chronic diseases including neurodegenerative conditions, chronic inflammatory diseases, alcoholic liver disease, cardiovascular disorders and diabetic complications [3, 10, 13, 15, 54].

Pharmacological efforts to attenuate oxidative injury in degenerative diseases have typically focused on drugs with antioxidant properties [48]. Such approaches provide a 'first line of defense' against free radicals, but do not target secondary products of oxidative stress, including numerous reactive  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes. A complementary strategy involves identification of low-molecular weight drugs possessing nucleophilic centers (e.g. primary amine groups) that exhibit high reactivity toward endogenous aldehydes. In biological systems such drugs might act as 'aldehyde scavengers', sparing cellular constituents and slowing disease progression [46].

The polyamines (spermine, spermidine and putrescine) are ornithine metabolic products, which are found at high concentrations in the brain [2, 57]. The primary and secondary amine moieties of polyamines always carry a charge at physiological pH, resulting in low molecular weight 'organic cations', the most important characteristic required for 'aldehyde scavengers'. This polycationic quality has attracted the attention of researchers and led to the hypothesis that polyamines could affect physiological systems by binding to anionic sites, such as



those associated with nucleic acids and membrane phospholipids [27]. These amines are involved with numerous cellular functions, including free radical scavenger, antioxidant and antiinflammatory properties [16, 32, 19, 23, 14, 1]. In addition, recent experimental evidence supports a role for polyamines as transcriptional regulators in the nucleus of neural eukaryotic cells [30]. However, the precise mechanisms by which polyamines exert their regulatory effects are unresolved. It has been reported that spermine inhibits both NADPH- and ascorbic acid-dependent lipid peroxidation in liver microsomes [29].

Quinolinic acid (QA) is a neuroactive metabolite of the tryptophan-kinurenine pathway which can be produced by macrophages and microglia [51, 11]. It is present in both the human and rat brain [58] and it has been implicated in the pathogenesis of a variety of human neurological diseases [6, 31]. QA is recognized pharmacologically as an endogenous glutamate agonist with a relative selectivity for the NMDA receptor in the brain [20]. Since it is not readily metabolized in the synaptic cleft, it stimulates the NMDA receptor for prolonged periods. This sustained stimulation results in opening of calcium channels causing  $Ca^{+2}$  influx followed by  $Ca^{+2}$  dependent-enhancement of free radical production leading to molecular damage and often to cell death [52, 9]. In addition, it has been reported that QA was able to stimulate lipid peroxidation in rat brain homogenates [39, 44]. These findings have suggested the involvement of free radicals and oxidative stress in the pattern of toxicity elicited by QA in the nervous system [41].

Sodium nitroprusside has been suggested to cause cytotoxicity through the release of cyanide and/or nitric oxide (NO) [4, 5]. There is a growing number of recent studies concerning the role of NO, a molecule that is regarded as universal neuronal messenger in the central nervous system, in the pathophysiology of such disorders as Alzheimer's and Parkinson's diseases, stroke, trauma, seizure disorders, etc. [8, 12, 34, 55]. NO is a free radical with short half-life (<30 s). Although NO acts independently, it also may cause neuronal damage in cooperation with other reactive oxygen species (ROS) [26, 35].

Therefore, the aim of this study was to verify the potential protective effects of spermine and spermidine against thiobarbituric reactive species (TBARS)

production induced by different pro-oxidant agents and provide an hypothesis of the mechanisms by which polyamines exert their regulatory effects.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Chemicals*

Tris(hydroxymethyl)aminomethane, spermine, spermidine, arcaine, quinolinic acid, thiobarbituric acid and malonaldehyde bis-(dimethyl acetal) (MDA) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). MK-801 was obtained from Research Biochemicals International (Natick, MA, USA). Sodium nitroprusside was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). EDTA (ethylenediaminetetraacetic), HCl, acetic acid were obtained from Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Ammonium iron(II) sulfate was obtained from Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). All chemicals tested were solved in water.

### *2.2. Animals*

All animal procedures were in strict accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. In these experiments, every effort was made to reduce the number and the suffering of the animals used. Two- to 3-month old Wistar rats (200 – 250 g) from our own breeding colony were used. They were maintained at 25°C, on a 12 h light/ 12 h dark cycle, with free access to food and water.

### *2.3. Production of TBARS*

Rats were decapitated under mild ether anesthesia and the cerebral tissue (whole brain) was rapidly dissected, placed on ice and weighed. Tissues were immediately homogenized in cold 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 (1/10, w/v) with ten up-and-down strokes at approximately 1200 rev / min in a Teflon-glass homogenizer. The homogenate was centrifuged for 10 min at 3.000 g to yield a pellet that was discarded and a low-speed supernatant (S1). Just after the end of centrifugation, an aliquot of 200  $\mu$ L or 100  $\mu$ L of S1 was incubated for 1 h at 37°C and then used

for lipid peroxidation determination. One rat brain was used per experiment. A summary of all tested substances, their concentrations and combinations is depicted in Table 1. Production of TBARS were determined as described by OHKAWA *et al.* (1979) excepting that the buffer of color reaction have a pH of 3.4. The color reaction was developed by adding 300  $\mu$ L 8.1% SDS to S1, followed by sequential addition of 600  $\mu$ L acetic acid/HCl (pH 3.4) and 600  $\mu$ L 0.8% TBA. This mixture was incubated at 95°C for 1 h.

TBARS produced were measured at 532 nm, and the absorbance was compared to that of a standard curve obtained using MDA.

Table 1 – Concentrations of spermine (SPM), spermidine (SPD), quinolinic acid (QA), sodium nitroprusside (SNP), MK-801, arcaine, Fe<sup>2+</sup>/EDTA complex and Fe<sup>2+</sup>. The concentrations presented in the same row of SPM or SPD, indicates that the substances were tested in combination with them.

<b>SPM</b>	<b>QA</b>	<b>SNP</b>	<b>MK-801</b>	<b>ARCAINE</b>	<b>Fe<sup>2+</sup>/EDTA</b>	<b>Fe<sup>2+</sup></b>
0.000033-2500 $\mu$ M	2 mM					
0.00033-2000 $\mu$ M		5 $\mu$ M				
30-1000 $\mu$ M	2 mM		1 mM			
1 mM	2 mM			10-1000 $\mu$ M		
100-2500 $\mu$ M					100 $\mu$ M	
1000 and 2500 $\mu$ M						1-100 $\mu$ M
<b>SPD</b>	<b>QA</b>	<b>SNP</b>	<b>MK-801</b>	<b>ARCAINE</b>	<b>Fe<sup>2+</sup>/EDTA</b>	<b>Fe<sup>2+</sup></b>
0.000033-2000 $\mu$ M	2mM					
330-20000 $\mu$ M		5 $\mu$ M				
100-2000 $\mu$ M	2 mM		1 mM			
1 mM	2 mM			10-1000 $\mu$ M		
10-2500 $\mu$ M					100 $\mu$ M	
1000 and 2500 $\mu$ M						1-100 $\mu$ M

#### 2.4. Statistical analysis

Data were analyzed statistically by two- or three-way ANOVA. Significant main effects will be presented only when two- or three-way interactions were not significant. Differences between groups were considered to be significant when  $P < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Quinolinic Acid vs. Polyamines:

Spermine (0.000033 to 3.33  $\mu\text{M}$ ) did not change the basal production of TBARS by brain homogenates. QA elicited a marked increase in TBARS production and this effect was not modified by spermine at the same concentrations range (data not shown). Similarly, spermidine (0.00003 to 0.002  $\mu\text{M}$ ) did not change the basal production of TBARS. QA caused a marked increase in TBARS production which was not counteracted by these concentrations of spermidine (data not shown).

At higher concentrations tested, spermine caused a pronounced reduction in a concentration dependent manner in TBARS production induced by QA, whereas it had a modest effect on the basal TBARS production. These effects were confirmed by the significant spermine vs. QA interaction ( $F_{(8,37)}=10.28$ ;  $P<0.001$ ). The calculated  $\text{IC}_{50}$  for TBARS production induced QA was about 230  $\mu\text{M}$  of spermine (Fig. 1A). Similarly, spermidine also reduced QA-induced TBARS production in a concentration dependent manner, but have negligible effect in the basal TBARS production. These effects were confirmed by the significant spermidine vs. QA interaction ( $F_{(5,36)}=5.38$ ;  $P<0.05$ ) and  $\text{IC}_{50}$  for QA-induced TBARS production by spermidine was 1300  $\mu\text{M}$  (Fig. 1B).

#### 3.2. Quinolinic acid vs. MK-801 vs. Polyamines:

The influence of MK-801, an antagonist of NMDA receptor, on the pro-oxidant effect of QA and antioxidant effect of polyamines is depicted in Fig 2. Three-way ANOVA revealed the following second order significant interactions: spermine vs.

QA ( $F_{(4,60)}=19.80$ ;  $P<0.001$ ), spermine vs. MK-801 interaction ( $F_{(4,60)}=4.82$ ;  $P<0.01$ ), and MK-801 vs. QA ( $F_{(1,60)}=80.47$ ;  $P<0.001$ ). As observed above (Fig. 1A), spermine reduced considerably the TBARS production induced by QA. Addition of MK-801 (1 mM) caused a marked reduction on the TBARS production stimulated by QA. Furthermore, in the presence of QA and MK-801, increasing concentrations of spermine caused an additional decrease in TBARS production to levels lower than that observed for basal condition or only in the presence of MK-801 (Fig. 2A). Three-way ANOVA revealed the following significant second order interactions: spermidine vs. QA ( $F_{(4,60)}=11.25$ ;  $P<0.001$ ), and QA vs. MK-801 ( $F_{(1,60)}=83.70$ ;  $P<0.001$ ). As observed above (Fig. 1B), spermidine reduced considerably the TBARS production induced by QA. Inclusion of 1 mM of MK-801 caused a marked reduction on the TBARS production stimulated by QA. Furthermore, in the presence of QA and MK-801, increasing concentrations of spermidine caused an additional decrease in TBARS production to levels lower than that observed for basal condition or only in the presence of MK-801 (Fig. 2B).

### 3.3. Quinolinic acid vs. Arcaine vs. Polyamines:

Arcaine, an antagonist of binding sites of polyamines on NMDA receptor, did not alter the basal or QA-induced TBARS production in the presence or absence of polyamines (data not shown).

### 3.4. Sodium nitroprusside vs. Polyamines:

Two-way ANOVA indicated that spermine caused a reduction in basal and SNP-induced TBARS production, when tested at 2 mM (Fig. 3A). In fact, ANOVA indicated a significant main effect of spermine ( $F_{(9,40)}=3.87$ ;  $P<0.01$ ) and of SNP ( $F_{(1,40)}=262.88$ ;  $P<0.001$ ). In parallel to spermine, spermidine also reduce the basal and SNP-triggered TBARS production, when tested at 20 mM. Two-way ANOVA yield a significant main effect of spermidine ( $F_{(5,24)}=5.15$ ;  $P<0.01$ ) and of SNP ( $F_{(1,24)}=622.62$ ;  $P<0.001$ ; Fig. 3B).

### 3.5. $Fe^{2+}$ /EDTA vs. Polyamines:

Two-way ANOVA yielded a significant spermine vs.  $Fe^{2+}$ /EDTA interaction ( $F_{(4,40)}=4.16$ ;  $P<0.01$ ).  $Fe^{2+}$ /EDTA caused a marked increase in TBARS production that was partially reduced by high concentrations of spermine (Fig. 4A). The calculated  $IC_{50}$  for TBARS production induced  $Fe^{2+}$ /EDTA was about 2630  $\mu$ M of spermine. Similarly, two-way ANOVA showed a significant spermidine vs.  $Fe^{2+}$ /EDTA interaction ( $F_{(4,40)}=9.70$ ;  $P<0.01$ ). High concentrations of spermidine partially decrease  $Fe^{2+}$ /EDTA-induced TBARS production. The  $IC_{50}$  for  $Fe^{2+}$ /EDTA-induced TBARS production by spermidine was not possible to calculate due to the weak effect of these polyamine (Fig. 4B).

### 3.6. Free $Fe^{2+}$ vs. Polyamines:

Increasing concentrations of  $Fe^{2+}$  stimulated significantly lipid peroxidation in brain homogenates and spermine counteracted this stimulation. The inhibitory effect of spermine was more evident at the higher concentration of  $Fe^{2+}$  tested (Fig. 5A). Two-way ANOVA revealed, in addition to the main effects of  $Fe^{2+}$  and spermine, a significant spermine vs.  $Fe^{2+}$  interaction ( $F_{(6,36)}=5.58$ ;  $P<0.001$ ). Spermidine also reduced  $Fe^{2+}$ -induced lipid peroxidation ( $F_{(2,24)}=32.7$ ;  $P<0.001$ ; Fig. 5B).

## 4. Discussion

The main findings of the present study can be summarized in the following topics: 1) spermine and spermidine reduced QA-induced lipid peroxidation; 2) spermine and spermidine, at relatively high concentrations, have a modest inhibitory effect against sodium nitroprusside-induced lipid peroxidation; and 3) at relatively high concentrations, both amines have a modest effect as inhibitors of  $Fe^{2+}$ - or  $Fe^{2+}$ /EDTA-induced TBARS production.

Taken together, these results can indicate that the antioxidant effect of these polyamines is more specific for certain toxins or pro-oxidant situations. In fact, at physiological concentrations, spermine has a considerable inhibitory effect against

QA-induced TBARS production, whereas spermidine has a modest inhibitory effect. In the presence of sodium nitroprusside or iron, the antioxidant effects of these polyamines were observed only at supraphysiological concentrations of the amines [47]. The modest effect of polyamines against nitroprusside-induced TBARS formation indicates some specificity of action of these amines. In all cases, spermine was a more potent reducer of TBARS production caused by these three pro-oxidant agents. These results can be related to the presence of more amine groups in the structure of spermine, when compared with spermidine.

In the present study, we realized that the pro-oxidant effects of QA are attributed to sustained stimulation of NMDA receptors, which induces free radical production and posterior lipid peroxidation [18, 42]. This assumption is supported by the fact that MK-801, a classical antagonist of NMDA receptors [59, 60, 43], suppresses TBARS production induced by QA.

Neurophysiological data indicates that the effect of spermine and spermidine on NMDA receptor activation is biphasic. At low concentrations polyamines enhance NMDA-evoked whole-cell currents, whereas higher concentrations of polyamines produced less or even inhibited NMDA receptor mediated currents [50, 56, 40]. So, at low micromolar concentrations (which are reported to facilitate the activation of NMDA receptor) spermine and spermidine did not modify TBARS production. These results indicate that the observed effects of polyamines are not related to the activation of NMDA receptor. Accordingly, the observed effects probably are related with free radical and/or aldehyde scavenger activity of polyamines. Probably these amines function like free radical scavengers since for 'aldehyde scavenger' activity it is necessary mainly low molecular weight and primary amino groups, found in both polyamines [46].

It is well known that iron and iron complexes stimulate lipid peroxidation in cells [21]. The mechanism(s) that underlies the antioxidant activity of polyamines measured in the presence of  $\text{Fe}^{2+}$  have been credited to the formation of a ternary complex with the phospholipid polar head and the  $\text{Fe}^{3+}$ , which in turn retards  $\text{Fe}^{2+}$  oxidation, reduces generation of reactive species [53]. Formation of such kind of ternary complexes in our assay system is possible and can, at least in part, explain

the antioxidant activity of spermine and spermidine. However, formation of such complexes are probably not involved in the protection caused by polyamines, because spermine and spermidine had only a weak protection effect against  $Fe^{2+}$ -induced lipid peroxidation.

In conclusion, the results of the present investigation support a scavenger and antioxidant role for polyamines in brain. However, the antioxidant activity of these compounds varied considerably depending on the agent used to induce TBARS formation and, to a less extent, on the polyamine considered. In fact, spermine was superior to spermidine as scavenger and/or antioxidant in all situations tested. Of particular importance, at physiological concentrations, polyamines reduced the TBARS production induced by QA, an endogenous neurotoxin that activates NMDA receptors and is supposed to be increased in neurodegenerative diseases such as Huntington [6, 31], raise the possibility of their use as therapeutic or preventive agents against these pathologic situations.

### **Acknowledgements**

This study was supported by CNPq (474241/2003-3, 523761/95-3 and 500096/2003-1), CAPES and FAPERGS (01/1338.9).

### **References**

- [1] R.M. Adibhatla, J.F. Hatcher, K. Sailor, R.J. Dempsey, Polyamines and central nervous system injury: spermine and spermidine decrease following transient focal cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats, *Brain Res.* 938 (2002) 81 – 86.
- [2] D.J. Anderson, J. Crossland, G.G. Shaw, The actions of spermidine and spermine on the central nervous system, *Neuropharmacology* 14 (1975) 571 – 577.
- [3] Y. Ando, T. Brannstrom, K. Uchida, N. Nyhlin, B. Nasman, O. Suhr, T. Yamashita, T. Olsson, M. El Salhy, M. Uchino, M. Ando, *Histochemical*



- detection of 4- hydroxynonenal protein in Alzheimer amyloid, *J. Neurol. Sci.* 156 (1998) 172 – 176.
- [4] W.P. Arnold, D.E. Longnecker, R.M. Epstein, Photodegradation of sodium nitroprusside: biologic activity and cyanide release, *Anesthesiology* 61 (1984) 254 – 260.
- [5] J.N. Bates, M.T. Baker, R. Guerra, D.G. Harrison, Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue, *Biochem. Pharmacol.* 42 (1990) S157 – S165.
- [6] M.F. Beal, N.W. Kowall, D.W. Ellison, M.F. Mazurek, K.J. Swartz, J.B. Martin, Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid, *Nature* 321 (1986) 168 – 171.
- [7] M.F. Beal, Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration, *Curr. Opin. Neurobiol.* 6 (1996) 661 – 666.
- [8] J. Bolanos, A. Almeida, Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia, *Biochim. Biophys. Acta* 1411 (1999) 415 – 436.
- [9] J. Cabrera, R.J. Reiter, D. Tan, W. Qi, R.M. Sainz, J.C. Mayo, J.J. Garcia, S.J. Kim, G. El-Sokkary, Melatonin reduces oxidative neurotoxicity due to quinolinic acid: In vitro and in vivo findings, *Neuropharmacology* 39 (2000) 507 – 514.
- [10] N.Y. Calingasan, K. Uchida, G.E. Gibson, Protein-bound acrolein: a novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease, *J. Neurochem.* 72 (1999) 751 – 756.
- [11] W. Cammer, Oligodendrocyte killing by quinolinic acid in vitro, *Brain Res.* 896 (2001) 157 – 160.
- [12] J. Castill, R. Rama, A. Davalos, Nitric oxide-related brain damage in acute ischemic stroke, *Stroke* 31 (2000) 852 – 857.
- [13] J. Chen, D.R. Petersen, S. Schenker, G.I. Henderson, Formation of malonaldehyde adducts in livers of rats exposed to ethanol: role in ethanol-mediated inhibition of cytochrome c oxidase, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 24 (2000) 544 – 552.

- [14] B.A. Coert, R.E. Anderson, F.B. Meyer, Exogenous spermine reduces ischemic damage in a model of focal cerebral ischemia in the rat, *Neurosci. Lett.* 282 (2000) 5 – 8.
- [15] M. Comporti, Lipid peroxidation and biogenic aldehydes: from the identification of 4-hydroxynonenal to further achievements in biopathology, *Free Radical Res.* 28 (1998) 623 – 635.
- [16] G. Drolet, E.B. Dumbroff, R.L. Legge, J.E. Thompson, Radical scavenging properties of polyamines, *Phytochemistry* 25 (1986) 367 – 371.
- [17] H. Esterbauer, R.J. Schaur, H. Zollner, Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes, *Free Radical Bio. Med.* 11 (1991) 81 – 128.
- [18] C.R. Evans, R. Burdon, Free radical-lipid interactions and their pathological consequences, *Prog. Lipid Res.* 32 (1993) 71 – 110.
- [19] R. Farbiszewsky, K. Bielawski, A. Bielawska, W. Sobaniec, Spermine protects in vivo the antioxidant enzymes in transiently hypoperfused rat brain, *Acta Neurobiol. Exp.* 55 (1995) 253 – 258.
- [20] G. Garthwaite, J. Garthwaite, Quinolate mimics neurotoxic actions of N-methyl-D-aspartate in rat cerebellar slices, *Neurosci. Lett.* 79 (1987) 35 – 39.
- [21] V. Gogvadze, P.B. Walter, B.N. Ames, The role of Fe<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation in the initiation of the mitochondrial permeability transition, *Arch. Biochem. Biophys.*, 414 (2003) 255 – 260.
- [22] M.E. Götz, G. Khnig, P. Riederer, M.B.H. Youdim, Oxidative stress: free radical production in neuronal degeneration, *Pharmacol. Ther.* 63 (1994) 37 – 122.
- [23] H.C. Ha, N.S. Sirisoma, P. Kuppusamy, J.L. Zweier, P.M. Woster, R.A. Casero Jr., The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 11140 – 11145.
- [24] B. Halliwell, Reactive oxygen species and the central nervous system, *J. Neurochem.* 59 (1992) 1609 – 1623.
- [25] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine*, third ed., Oxford University Press, Oxford, UK, 1999.

- [26] R.E. Huie, S. Padmaja, The reaction of NO with superoxide. *Free Radical Res. Commun.* 18 (1993) 195 – 199.
- [27] T.D. Johnson, Modulation of channel function by polyamines, *Trends Pharmacol. Sci.* 17 (1996) 22 – 27.
- [28] J. Kedziora, G. Bartosz, Dow's syndrome: a pathology involving the lack of balance of reactive oxygen species, *Free Radical Bio. Med.* 4 (1988) 317 – 330.
- [29] M. Kitada, K. Igarashi, S. Hirose, H. Kitagawa, Inhibition by polyamines of lipid peroxide formation in rat liver microsomes, *Biochem. Biophys. Res. Co.* 87 (1979) 388 – 394.
- [30] N. Kuramoto, K. Inoue, K. Gion, K. Takano, K. Sakata, K. Ogita, Y. Yoneda, Modulation of DNA binding of nuclear transcription factors with leucine-zipper motifs by particular endogenous polyamines in murine central and peripheral excitable tissues, *Brain Res.* 967 (2003) 170 – 180.
- [31] S.A. Lipton, P.A. Rosenberg, Mechanisms of disease: excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders, *New Engl. J. Med.* 330 (1994) 613 – 622.
- [32] E. Lovaas, G. Carlin, Spermine: an anti-oxidant and anti-inflammatory agent, *Free Radical Bio. Med.* 11 (1991) 455 – 461.
- [33] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.* 95 (1979) 351 – 358.
- [34] H. Prast, A. Philippou, Nitric oxide as modulator of neuronal function, *Prog. Neurobiol.* 64 (2001) 51 – 68.
- [35] W.A. Pryor, G.L. Squadrito, The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol.* 268 (1995) L699 – 722.
- [36] I.J. Reynolds, Arcaine uncovers dual interactions of polyamines with the N-methyl-D-aspartate receptor, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255 (1990) 1001 – 1007.
- [37] R.J. Reiter, Oxidative processes and oxidative defense mechanisms in the aging brain, *FASEB J.* 9 (1995) 526 – 533.

- [38] R.J. Reiter, Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin, *Prog. Neurobiol.* 56 (1998) 359 – 384.
- [39] C. Ríos, A. Santamaría, Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates, *Neurochem. Res.* 16 (1991) 1139 – 1141.
- [40] D.M. Rock, R.L. Macdonald, Spermine and related polyamines produce a voltage-dependent reduction of *N*-methyl-D-aspartate receptor single-channel conductance, *Mol. Pharmacol.* 42 (1992) 157 – 164.
- [41] E. Rodríguez-Martínez, A. Camacho, P.D. Maldonado, J. Pedraza-Chaverrí, D. Santamaría, S. Galván-Arzate, A. Santamaría, Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum, *Brain Res.* 858 (2000) 436 – 439.
- [42] A. Santamaría, R. Salvatierra-Sanchez, B. Vazquez-Roman, D. Santiago-Lopez, J. Villeda-Hernandez, S. Galvan-Arzates, M.E. Jimenez-Capdeville, S.F. Ali, Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vitro and in vivo studies, *J. Neurochem.* 86 (2003) 479 – 488.
- [43] A. Santamaría, C. Ríos, MK-801, a *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum, *Neurosci. Lett.* 159 (1993) 51 – 54.
- [44] A. Santamaría, D. Santamaría, M. Diaz-Munoz, V. Espinoza-Gonzalez, C. Ríos, Effects of *N* omega-nitro-L-arginine and L-arginine on quinolinic acid-induced lipid peroxidation, *Toxicol. Lett.* 93 (1997) 117 – 124.
- [45] A.H.V. Schapira, Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, Huntington's disease, hereditary spastic paraplegia and Friedreich's ataxia, *BBA – Mol. Basis Dis.* 1410 (1999) 159 – 170.
- [46] H.K. Shapiro, Carbonyl-trapping therapeutic strategies, *Am. J. Ther.* 5 (1998) 323 – 353.
- [47] G.G. Shaw, A.J. Pateman, The regional distribution of the polyamine spermidine and spermine in brain, *J. Neurochem.* 20 (1973) 1225 – 1230.
- [48] H. Sies, Antioxidants in disease: mechanisms and therapy, *Adv. Pharmacol.* 38 (1997) Entire volume.

- [49] N.A. Simonian, J.T. Coyle, Oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36 (1996) 83 – 106.
- [50] T. Sprosen, G.N. Woodruff, Polyamines potentiate NMDA induced whole-cell currents in cultured striatal neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 179 (1990) 477 – 478.
- [51] T.W. Stone, Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids, *Pharmacol. Rev.* 45 (1993) 309 – 379.
- [52] T.W. Stone, M.N. Perkins, Quinolinic acid: a potent endogenous excitant amino acid receptors in CNS, *Eur. J. Pharmacol.* 72 (1981) 411 – 412.
- [53] B. Tadolini, Polyamine inhibition of lipoperoxidation – The influence of polyamines on iron oxidation in the presence of compounds mimicking phospholipid polar heads, *Biochem. J.* 249 (1988) 33 – 36.
- [54] K. Uchida, Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases, *Free Radical Bio. Med.* 28 (2000) 1685 – 1696.
- [55] H. Weisinger, Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system, *Prog. Neurobiol.* 64 (2001) 365 – 391.
- [56] K. Williams, V.L. Dawson, C. Romano, M.A. Dichter, P.B. Molinoff, Characterization of polyamines having agonist, antagonist and inverse agonist effects at the polyamine recognition site of the NMDA receptor, *Neuron* 5 (1990) 199 – 208.
- [57] K. Williams, C. Romano, M.A. Dichter, P.B. Molinoff, Modulation of the NMDA receptor by polyamines, *Life Sci.* 48 (1991) 469 – 498.
- [58] M. Wolfensberger, U. Amsler, M. Cuenod, A.C. Foster, W.O. Whetsell Jr., R. Schwarcz, Identifications of quinolinic acid in rat and human brain tissue, *Neurosci. Lett.* 41 (1983) 247 – 252.
- [59] E.H. Wong, J.A. Kemp, T. Priestley, A.R. Knight, G.N. Woodruff, L.L. Iversen, The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83 (1986) 7104 – 7108.
- [60] S.G. Zhu, E.G. McGeer, P.L. McGeer, Effect of MK-801, kynurenate, glycine, dextrorphan and 4-acetylpyridine on striatal toxicity of quinolinate, *Brain Res.* 481 (1989) 356 – 360.

FIG. 1

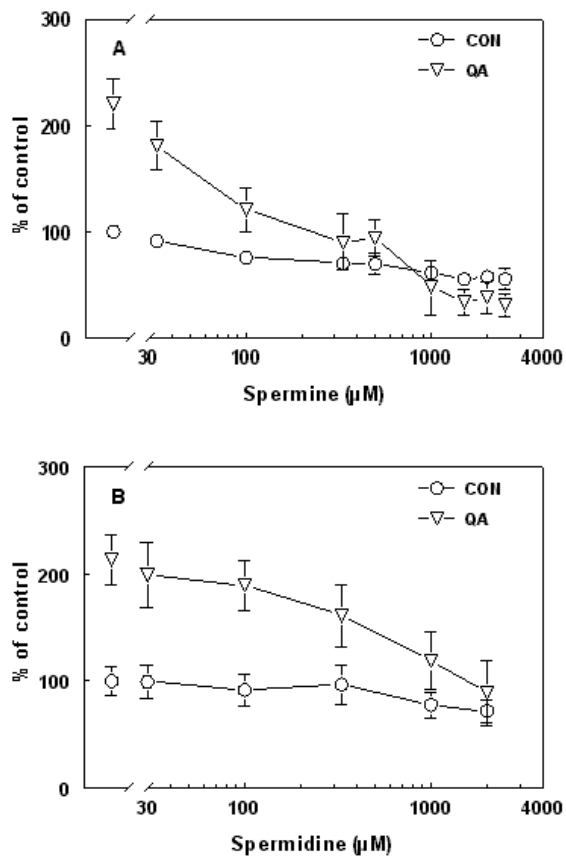


Fig. 1. Effect of different concentrations of spermine (A) and spermidine (B) on basal and QA (2 mM)-induced TBARS production in whole rat brain homogenates. TBARS formation was expressed as nmol of malondialdehyde (MDA) per gram of tissue per hour. Data shown mean  $\pm$  S.E.M. values averaged from three independent experiments performed in duplicate and are presented as percentage of control values obtained in absence of polyamines and QA. Control value was 144.38 nmol MDA/g tissue/h for spermine and 176.63 nmol MDA/g tissue/h for spermidine.

FIG. 2

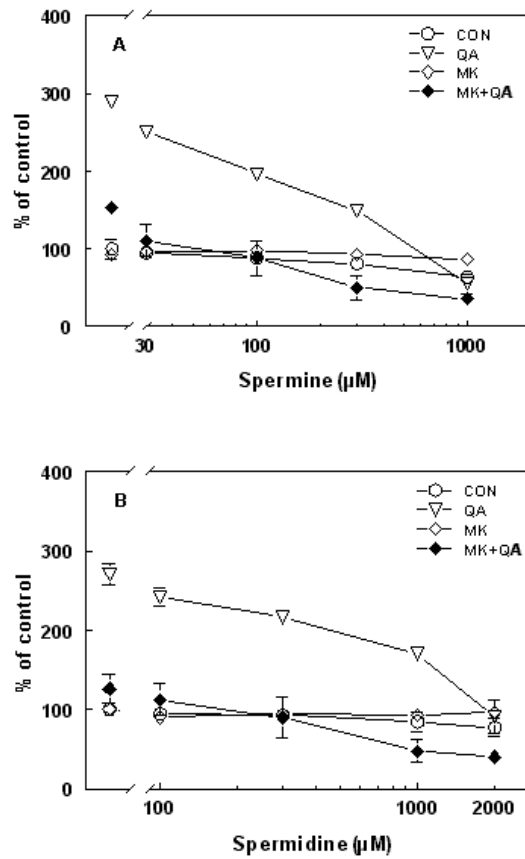


Fig. 2. Effect of different concentrations of spermine (A) and spermidine (B) on basal, MK-801 (1 mM), QA (2 mM) and QA (2 mM) plus MK-801 (1 mM) TBARS production in whole rat brain homogenates. TBARS formation was expressed as nmol of malondialdehyde (MDA) per gram of tissue per hour. Data shown mean  $\pm$  S.E.M. values averaged from four independent experiments performed in duplicate and are presented as percentage of control values obtained in absence of polyamines, QA and MK-801. Control value was 180.17 nmol MDA/g tissue/h for spermine and 185.83 nmol MDA/g tissue/h for spermidine.

FIG. 3

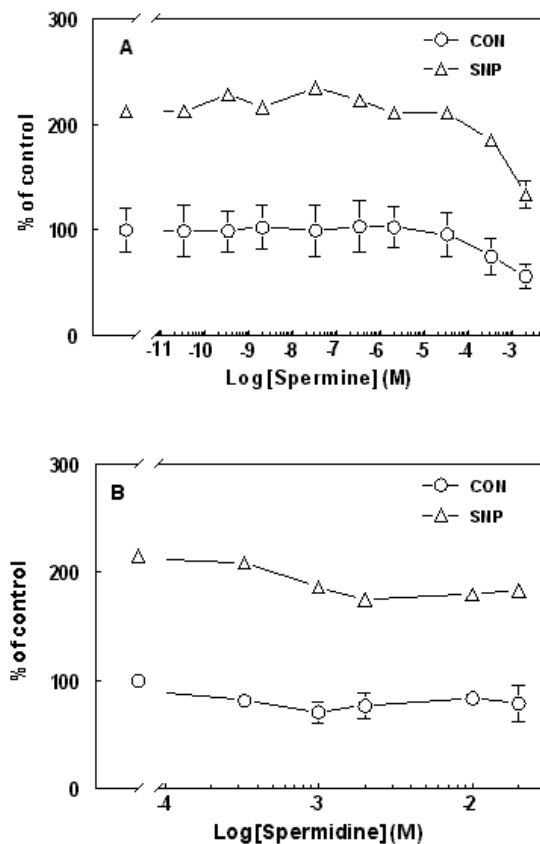


Fig. 3. Effect of different concentrations of spermine (A) and spermidine (B) on basal and SNP (5  $\mu$ M)-induced TBARS production in whole rat brain homogenates. TBARS formation was expressed as nmol of malondialdehyde (MDA) per gram of tissue per hour. Data shown mean  $\pm$  S.E.M. values averaged from three independent experiments performed in duplicate and are presented as percentage of control values obtained in absence of polyamines and SNP. Control value was 155.83 nmol MDA/g tissue/h for spermine and 159.33 nmol MDA/g tissue/h for spermidine.



FIG. 4

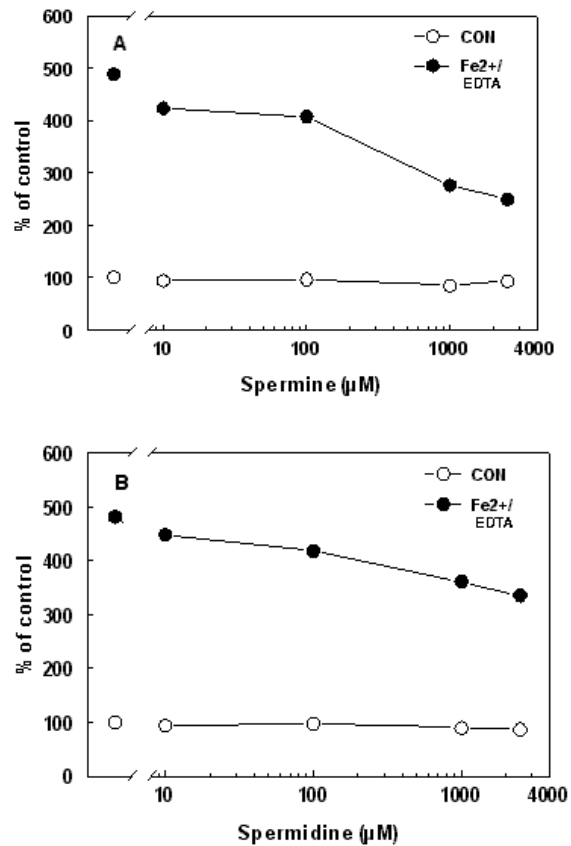


Fig. 4. Effect of different concentrations of spermine (A) and spermidine (B) on basal and Fe<sup>2+</sup>/EDTA (100 μM)-induced TBARS production in whole rat brain homogenates. TBARS formation was expressed as nmol of malondialdehyde (MDA) per gram of tissue per hour. Data shown mean ± S.E.M. values averaged from five independent experiments performed in duplicate and are presented as percentage of control values obtained in absence of polyamines and Fe<sup>2+</sup>/EDTA. Control value was 158.10 nmol MDA/g tissue/h for spermine and 176.00 nmol MDA/g tissue/h for spermidine.

FIG. 5

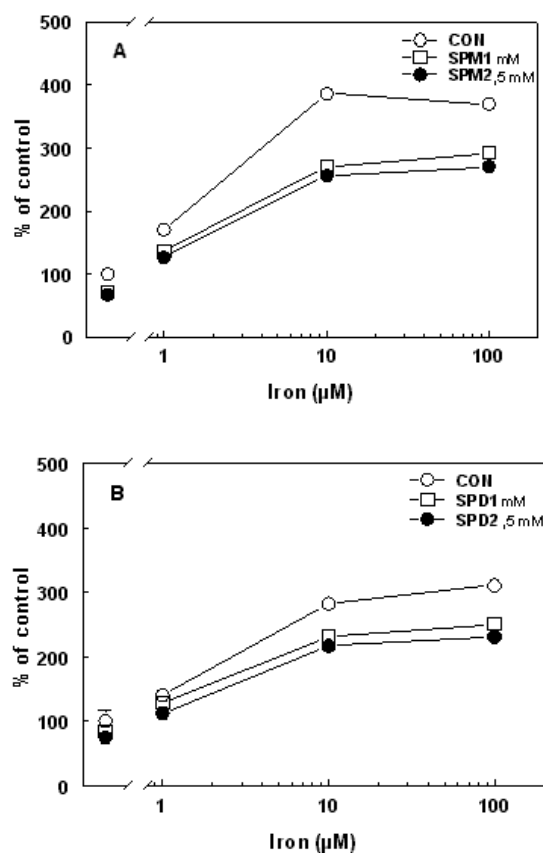


Fig. 5. Effect of different concentrations of iron on basal and 1 or 2.5 mM spermine (A) and 1 or 2.5 mM spermidine (B) TBARS production in whole rat brain homogenates. TBARS formation was expressed as nmol of malondialdehyde (MDA) per gram of tissue per hour. Data shown mean  $\pm$  S.E.M. values averaged from four independent experiments performed in duplicate and are presented as percentage of control values obtained in absence of iron and polyamines. Control value was 185.75 nmol MDA/g tissue/h for spermine and 187.46 nmol MDA/g tissue/h for spermidine.

---

#### **IV. ANEXO**

Este anexo apresenta uma parte do trabalho experimental que não é exibida no artigo. Consta aqui os resultados obtidos dos dois experimentos realizados com ambas poliaminas que estão apenas citados no artigo.

## RESULTADOS

A ANOVA de duas vias revelou que a espermina, nas menores concentrações testadas, não alterou a produção de TBARS espontânea ( $F_{(6,42)}=1.37$ ;  $P>0.05$ ). O ácido quinolínico, por sua vez, obteve um marcante aumento na produção de TBARS ( $F_{(1,42)}=162.36$ ;  $P<0.001$ ), mas este efeito não foi modificado pela espermina na mesma faixa de concentração. De fato, a interação espermina vs. AQ não foi significativa ( $F_{(6,42)}=1.48$ ;  $P>0.05$ ; figura 8A). Similarmente, a ANOVA de duas vias revelou que a espermidina, nas menores concentrações testadas, também não alterou a produção de TBARS espontânea ( $F_{(6,28)}=0.29$ ;  $P>0.05$ ). O AQ causou um acentuado aumento na produção de TBARS ( $F_{(1,28)}=129.14$ ;  $P<0.001$ ) o qual não foi afetado pelas mesmas concentrações de espermidina ( $F_{(6,28)}=0.17$ ;  $P>0.05$ ; figura 8B).

A ANOVA de três vias revelou significativa a interação de segunda ordem espermina vs. AQ ( $F_{(1,48)}=69.12$ ;  $P<0.001$ ). Isto ocorreu porque a espermina reduziu mais a produção de TBARS na condição estimulada pelo AQ do que na condição não estimulada. ANOVA também mostrou não significativa a interação espermina vs. AQ vs. arcaína ( $F_{(3,48)}=0.77$ ;  $P>0.05$ ; figura 9A). De modo semelhante à espermina, a ANOVA de três vias revelou como sendo significativa a interação espermidina vs. AQ ( $F_{(1,32)}=28.51$ ;  $P<0.001$ ). Esta interação foi

significativa devido ao fato que a espermidina causou uma redução na produção de TBARS estimulada pelo AQ. Do mesmo modo, a interação espermidina vs. AQ vs. arcaína não foi significativa ( $F_{(3,32)}=1.26$ ;  $P>0.05$ ; figura 9B). Estes resultados indicam que a arcaína não altera a produção de TBARS induzida pelo AQ na presença de ambas poliaminas.

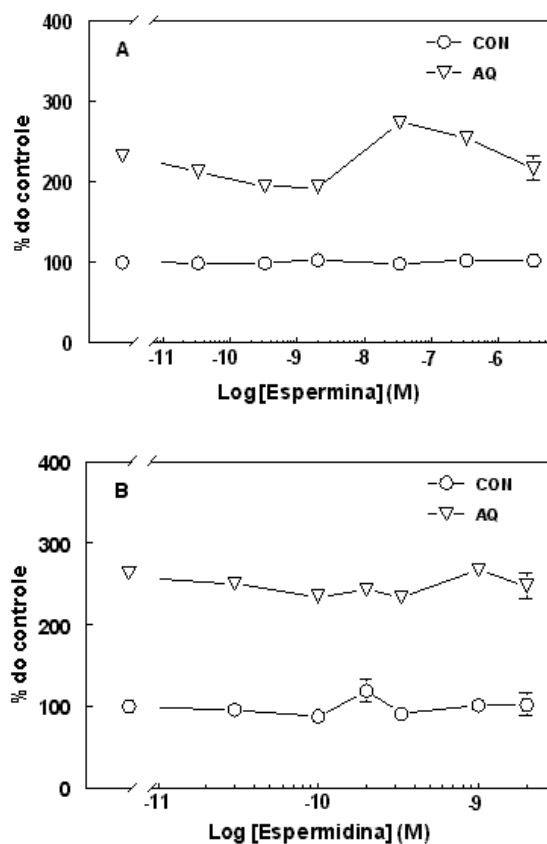


Figura 8. Efeito de diferentes concentrações de espermina (A) e espermidina (B) sobre a produção de TBARS espontânea e induzida por AQ (2 mM) em homogeneizado de encéfalo de rato. A produção de TBARS foi expressa como nmol de malondialdeído (MDA) por grama de tecido por hora. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão, a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata e são apresentados como porcentagem dos valores do controle, obtidos na ausência das poliaminas e do AQ. O valor do controle foi 145.00 nmol MDA/g tecido/h para a espermina e 130.50 nmol MDA/g tecido/h para a espermidina.

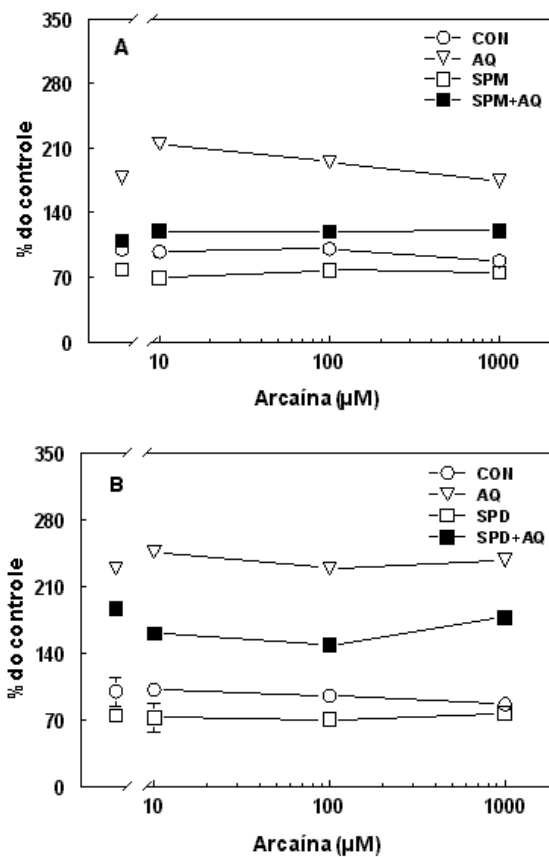


Figura 9. Efeito da arcaína sobre a produção de TBARS espontânea, na presença de 1 mM de espermina (A) ou 1 mM de espermidina (B) e sobre a produção de TBARS induzida por ácido quinolínico (2 mM) em encéfalo de rato. A produção de TBARS foi expressa como nmol de malondialdeído (MDA) por grama de tecido por hora. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão, a partir de quatro experimentos independentes realizados em duplicata e estão apresentados como porcentagem dos valores do controle, obtidos na ausência da arcaína, das poliaminas e do AQ. O valor do controle foi 196.12 nmol MDA/g tecido/h para a espermina e 192.16 nmol MDA/g tecido/h para a espermidina.

---

## V. DISCUSSÃO



Os principais achados do presente estudo podem ser resumidos nos seguintes tópicos:

- Espermina e espermidina reduziram a lipoperoxidação induzida por ácido quinolínico;
- Espermina e espermidina, em concentrações relativamente altas, tiveram um modesto efeito inibitório contra a lipoperoxidação induzida por nitroprussiato de sódio;
- Espermina e espermidina, em concentrações relativamente altas, tiveram um modesto efeito como inibidoras da lipoperoxidação induzida tanto por ferro complexado ( $\text{Fe}^{2+}/\text{EDTA}$ ) quanto por ferro livre ( $\text{Fe}^{2+}$ ).

Estes resultados indicam que o efeito inibitório destas poliaminas foi mais específico para certas toxinas ou situações pró-oxidantes. De fato, em concentrações fisiológicas –  $\mu\text{M}$  (SHAW & PATEMAN, 1973), ambas poliaminas tiveram um efeito inibitório considerável contra a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) induzida por ácido quinolínico. Contudo, na presença de nitroprussiato de sódio ou ferro, o efeito inibitório das poliaminas foi observado somente em concentrações suprafisiológicas das mesmas –  $\text{mM}$ . Desta maneira, o expressivo efeito das poliaminas em relação à formação de TBARS induzida pelo ácido quinolínico e o modesto efeito das mesmas contra a formação de TBARS induzida por nitroprussiato de sódio ou ferro indicaram alguma especificidade de ação destas aminas.

Relatos da literatura sugerem que os efeitos pró-oxidantes do ácido quinolínico são atribuídos à excessiva estimulação dos receptores NMDA, o qual por sua vez induz a produção de radicais livres e posterior lipoperoxidação (RICE-EVANS & BURDON, 1993; SANTAMARIA *et al.*, 2003). Esta suposição tem respaldo pelo fato de que, em nosso trabalho, o MK-801, um antagonista clássico dos receptores NMDA (WONG *et al.*, 1986; SANTAMARIA & RÍOS, 1993), suprimiu a produção de TBARS induzida pelo ácido quinolínico.

Sabe-se que durante o processo de lipoperoxidação há a formação de hidroperóxidos lipídicos. Estes compostos podem sofrer quebra catalisada por metais de transição, gerando mais radicais livres, os quais por sua vez podem dar início a novos ciclos de lipoperoxidação e propagar as reações em cadeia, amplificando assim a lesão inicial (RICE-EVANS & BURDON, 1993). A quebra das ligações de carbono durante as reações da lipoperoxidação resultam na formação de produtos aldeídicos.

Os produtos resultantes da lipoperoxidação são tóxicos e podem formar bases de Schiff juntamente com grupamentos amino, proteínas ou sofrer interação com grupos tióis, podendo assim mediar a inativação de enzimas, além de outras propriedades citotóxicas (RICE-EVANS & BURDON, 1993; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; BURCHAM, 2002). Os elevados níveis destes aldeídos em certos estados patológicos podem estar associados com a etiologia de algumas doenças neurodegenerativas crônicas como doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington (ANDO *et al.*, 1998; CALINGASAN *et al.*, 1999).

Drogas com propriedades antioxidantes geralmente são enfocadas como alternativa farmacológica para atenuar a injúria oxidativa em doenças

degenerativas (SIES, 1997). Tal enfoque fornece uma primeira linha de defesa contra os radicais livres, mas não enfoca os produtos secundários do estresse oxidativo. Uma estratégia complementar envolve a identificação de drogas com baixo peso molecular possuindo centros nucleofílicos (grupos amino primários) que exibem alta reatividade contra aldeídos endógenos. Em sistemas biológicos, tais drogas devem agir como “removedoras de aldeídos”, preservando os constituintes celulares e retardando a progressão da doença (SHAPIRO, 1998).

Estudos prévios têm demonstrado que as poliaminas atuam diretamente como “removedoras de radicais livres” (DROLET *et al.*, 1986; KHAN *et al.*, 1992a; 1992b; HA *et al.*, 1998; ADIBHATLA *et al.*, 2002). Contudo, as características estruturais destas moléculas permitem que elas possam ter atividade também como “removedoras de aldeídos”. De fato, as poliaminas são aminas alifáticas simples que carregam grupos amino primários em cada extremidade da cadeia, resultando em cátions orgânicos de baixo peso molecular (CARTER, 1994; JOHNSON, 1996); características estas requeridas para um composto agir como “removedor de aldeídos”. Em todas as situações pró-oxidantes testadas no presente estudo, a espermina obteve um efeito mais potente em reduzir a produção de TBARS quando comparada à espermidina. Estes resultados podem estar relacionados ao número de grupamentos amino na estrutura destas poliaminas, visto que a espermina possui quatro grupamentos amino contra três grupamentos amino da espermidina.

Estas aminas poderiam, pelo menos em parte, estar atuando como “removedoras de aldeídos”. No entanto, os dados obtidos neste estudo sugerem que os mecanismos pelos quais as poliaminas atuaram foram preferencialmente

como “removedoras de radicais livres”, visto que elas tiveram atividade diferenciada uma da outra. Se elas atuassem preferencialmente como “removedoras de aldeídos”, ambas poliaminas deveriam ter o mesmo efeito já que ambas possuem a mesma quantidade de grupos amino primários e baixo peso molecular.

Dados neurofisiológicos indicam que o efeito da espermina e espermidina na ativação do receptor NMDA é bifásico. Em baixas concentrações, as poliaminas aumentam a condutância do receptor NMDA; em altas concentrações diminuem ou até mesmo inibem a condutância deste receptor (SPROSEN & WOODRUFF, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1990; ROCK & MACDONALD, 1992). Contudo, nas menores concentrações testadas neste estudo (baixas concentrações micromolares) – as quais facilitam a ativação do receptor NMDA – espermina e espermidina não modificaram a produção de TBARS. Estes resultados indicam que os efeitos observados para estas poliaminas não estavam relacionados à ativação do receptor NMDA. De fato, se as poliaminas atuassem estimulando o complexo NMDA, esperaria-se obter um efeito pró-oxidante das mesmas.

Adicionalmente, existem outros argumentos em evidência neste estudo que reforçam a idéia de que o efeito observado das poliaminas não estava relacionado com a ativação do receptor NMDA:

- Na presença do ácido quinolínico e MK-801, as poliaminas tiveram um efeito adicional na redução da produção de TBARS. Neste caso, as poliaminas não podiam atuar via receptor NMDA uma vez que o MK-801 bloqueia o canal deste receptor (WONG *et al.*, 1986; SANTAMARIA & RÍOS, 1993);

- A arcaína, um antagonista do sítio das poliaminas no receptor NMDA (REYNOLDS, 1990), não reverteu o efeito das poliaminas.

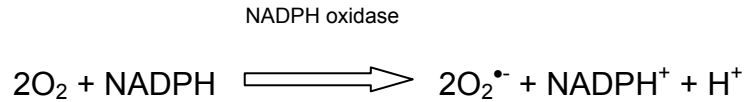
Dessa maneira, conclui-se que o mecanismo pelo qual as poliaminas reduziram a produção de TBARS não foi via receptor NMDA, mas provavelmente, via remoção dos radicais livres gerados.

Contudo, como explicar a maior especificidade de ação destas aminas já que seu efeito foi mais expressivo quando a produção de TBARS foi induzida por ácido quinolínico? Sabendo-se que as poliaminas, além de serem efetivas removedoras de radicais livres, são moléculas que exibem carga positiva, pode-se sugerir que elas sejam mais específicas para determinados tipos de radicais livres. Preferencialmente, aqueles que possuam carga negativa – como o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), por exemplo.

O nitroprussiato de sódio é um doador clássico de óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ). O ferro, por sua vez, gera principalmente o radical hidroxil ( $^{\bullet}OH$ ), via reação de Fenton. Ambos radicais não possuem carga negativa, em contraste com o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ).

Em condições biológicas normais, o  $O_2$  é transformado em  $H_2O$  na quarta etapa das reações de transferência de elétrons, na mitocôndria (Fig. 8). Na primeira etapa desta reação, o radical superóxido é gerado a partir da oxidação do NADPH e conseqüente redução do  $O_2$  (esquema I).

Este ânion superóxido pode, ocasionalmente, escapar antes da próxima etapa reacional. Cerca de 1 – 4% de todo o oxigênio transformado está submetido a tal processo de vazamento (SPITELLER, 2003).



ESQUEMA I. Reação de geração do radical ânion superóxido (adaptado de RICE-EVANS & BURDON, 1993).

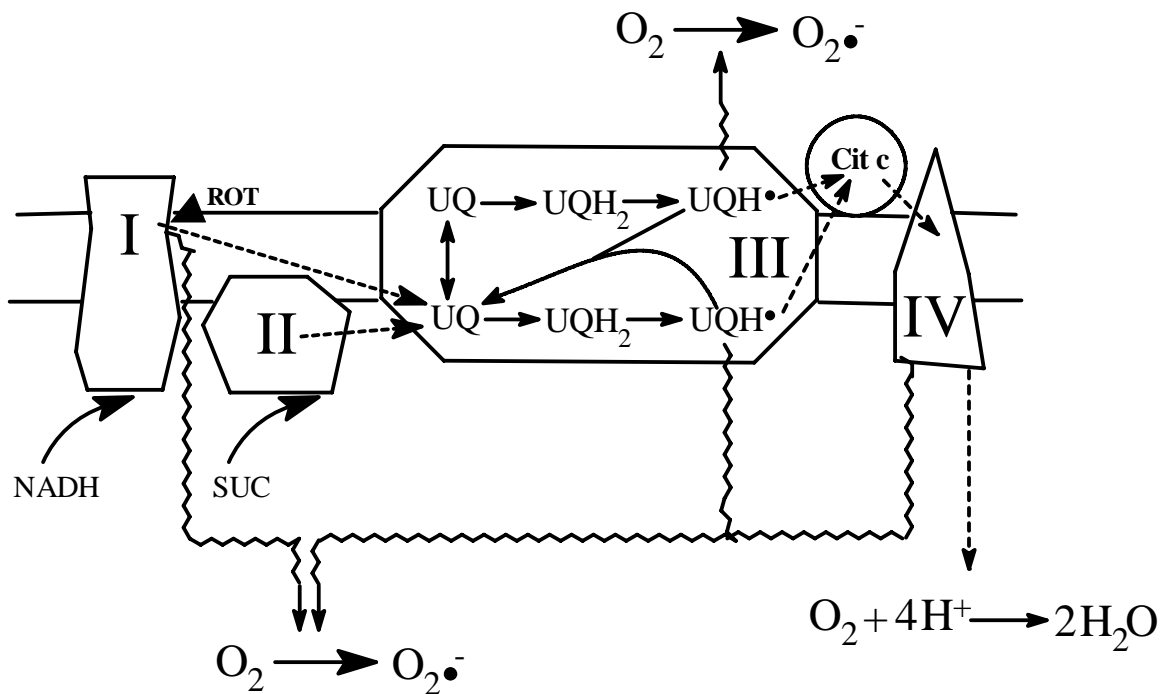
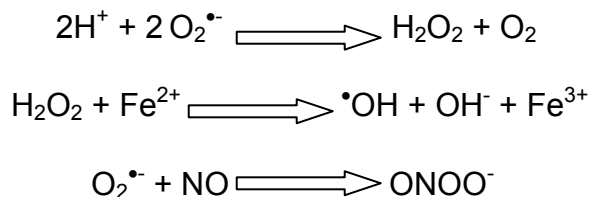


FIGURA 10. Cadeia respiratória mitocondrial e a geração do radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (adaptado de KOWALTOWSKI & VERCESI, 2001).

No entanto, em condições patológicas, o tecido lesionado sofre as reações de geração de radicais muito mais facilmente que os tecidos normais. Tal condição envolve inicialmente a geração excessiva do radical superóxido (RICE-

EVANS & BURDON, 1993). Essa geração excessiva de radicais superóxido pode ser explicada por uma disfunção mitocondrial relativa ao estado patológico. A partir do radical superóxido, outras espécies radicalares podem ser geradas (esquema 2).

Superóxido dismutase



ESQUEMA II. Reações de geração de outras espécies radicalares a partir do radical ânion superóxido (adaptado de RICE-EVANS & BURDON, 1993).

No entanto, nem o radical superóxido nem o peróxido de hidrogênio são muito citotóxicos *per se*; mas sua reatividade pode ser amplificada *in vitro* pela interação com componentes específicos tais como metais de transição ou óxido nítrico (RICE-EVANS & BURDON, 1993).

Sabe-se que a ativação do receptor NMDA induz a um aumento na produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{NO}^{\bullet}$  (NICHOLLS & BUDD, 1998; ISHIKAWA *et al.*, 1999). Sendo assim, o ácido quinolínico, um agonista direto do receptor NMDA, ao ligar-se no mesmo provavelmente dispare, entre outros eventos, a geração dos radicais superóxido. Isto explicaria a maior especificidade de ação das poliaminas frente à lipoperoxidação induzida por este ácido. Adicionalmente, como já foi dito, a espermina foi mais potente redutora da produção de TBARS induzida pelo ácido quinolínico. Este resultado pode estar relacionado à presença de mais cargas

positivas na estrutura da espermina, quando comparado à espermidina. Quanto mais cargas positivas, maior a capacidade de remoção de radicais livres contendo cargas negativas.

Em adição, pode haver uma outra explicação para a maior especificidade das poliaminas em relação ao ácido quinolínico: vários estudos relatam que tanto o NO quanto o aumento da atividade da ONS podem participar da neurotoxicidade e stress oxidativo induzidos pelo AQ (SANTAMARÍA *et al.*, 1997; 1998; 1999). Assim sendo, inibidores da ONS têm a habilidade de reverter o dano oxidativo causado por este ácido. Foi mostrado por Santamaría *et al.* (1998) que o L-NAME, um conhecido inibidor da ONS, reverteu o aumento da atividade desta enzima bem como o aumento da lipoperoxidação induzidos pela administração de AQ. Além disso, a lipoperoxidação induzida pelo AQ em sinaptossomas ou em fatias estriatais de cérebros de ratos também foi revertida de modo concentração-dependente pelo L-NARG, um outro inibidor seletivo da ONS (SANTAMARÍA *et al.*, 1997; 1999). Estes resultados mostram um efeito direto do AQ no aumento da lipoperoxidação, independentemente do envolvimento de receptores NMDA. Assim como o L-NAME ou o L-NARG, as poliaminas também são capazes de inibir a ONS. Como já citado anteriormente, as poliaminas com seus grupamentos carregados positivamente, podem bloquear a síntese de óxido nítrico (HU *et al.*, 1994). Dessa maneira, estas aminas poderiam estar reduzindo a lipoperoxidação de várias formas: além de agirem como removedoras de radicais livres, elas ainda poderiam estar inibindo a ONS e impedindo a geração dos danosos radicais NO.

Sabe-se que o ferro e complexos de ferro estimulam a lipoperoxidação nas células (GOGVADZE *et al.*, 2003). O mecanismo em que baseia-se a atividade



antioxidante das poliaminas em relação à lipoperoxidação induzida por este metal tem sido creditada à formação de um complexo ternário destas aminas com as cabeças polares dos fosfolípidios e o  $\text{Fe}^{3+}$ , que por sua vez, retarda a oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$ , reduzindo a geração de espécies reativas (TADOLINI, 1988). A formação de tal complexo ternário em nosso estudo é possível e pode, pelo menos em parte, explicar a atividade antioxidante da espermina e da espermidina. Contudo, a formação destes complexos provavelmente não estavam envolvidos na proteção ocasionada pelas poliaminas, visto que tanto a espermina quanto a espermidina tiveram somente uma fraca proteção contra a lipoperoxidação induzida pelo ferro.

---

## **VI. CONCLUSÃO**

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que:

- Espermina e espermidina, nas menores concentrações testadas (nM), não tiveram efeito significativo sobre a lipoperoxidação espontânea. Contudo, nas maiores concentrações ( $\mu\text{M}$ ) elas obtiveram um modesto efeito redutor sobre a lipoperoxidação espontânea.

- Espermina e espermidina, em concentrações nanomolares, não tiveram efeito significativo sobre a lipoperoxidação induzida por ácido quinolínico ou por nitroprussiato de sódio. Contudo, em concentrações micromolares, ambas poliaminas reduziram a lipoperoxidação induzida por ácido quinolínico. No entanto, sobre a lipoperoxidação induzida por nitroprussiato de sódio elas tiveram um leve efeito redutor, e somente em altas concentrações milimolares. Similarmente, sobre a lipoperoxidação induzida por ferro/EDTA complexado ou por ferro livre, tanto espermina quanto espermidina tiveram um modesto efeito e somente em concentrações milimolares, muito acima das concentrações fisiológicas. Em todos estes casos, a espermina foi mais eficiente redutora da lipoperoxidação que a espermidina.

- O MK-801, um bloqueador do canal do receptor NMDA, não teve efeito *per se* sobre a lipoperoxidação na ausência ou na presença da espermina ou da espermidina. A arcaína, um antagonista do sítio das poliaminas no receptor NMDA, também não teve efeito *per se* sobre a lipoperoxidação na ausência ou na presença das poliaminas.

- Tanto a espermina quanto a espermidina demonstraram um efeito potencializado na presença do MK-801 na redução da lipoperoxidação induzida por ácido quinolínico. Contudo, ambas poliaminas não tiveram seu efeito alterado pela adição de arcaína ao meio reacional quando na presença de ácido quinolínico.

- Sugere-se que o efeito inibitório da lipoperoxidação de ambas poliaminas tenha sido através da remoção dos radicais livres gerados nestes sistemas e não tenham relação com o receptor NMDA. Além disto, sugere-se que as poliaminas sejam mais específicas para a remoção do radical ânion superóxido. O radical ânion superóxido é o precursor das demais espécies reativas de oxigênio; removendo este radical livre, as poliaminas preveniriam a geração dos demais radicais livres. Estes resultados reforçam o papel protetor das poliaminas no encéfalo. Contudo, a atividade protetora destes compostos varia consideravelmente dependendo do agente usado para induzir a lipoperoxidação e, em menor extensão, da poliamina considerada. De fato, a espermina foi mais eficaz na redução da lipoperoxidação em todas as situações testadas, provavelmente devido ao maior número de cargas positivas em sua estrutura molecular.

---

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIBHATLA, R. M., HATCHER, J. F., SAILOR, K. & DEMPSEY, R. J. Polyamines and central nervous system injury: spermine and spermidine decrease following transient focal cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. **Brain Research, 938:** 81 – 86, 2002.
- ANDO, Y., BRANNSTROM, T., UCHIDA, K., NYHLIN, N., NASMAN, B., SUHR, O., YAMASHITA, T., OLSSON, T., EL SALHY, M., UCHINO, M. & ANDO, M. Histochemical detection of 4- hydroxynonenal protein in Alzheimer amyloid. **Journal of the Neurological Sciences, 156:** 172 – 176, 1998.
- APELBAUM, A., BURGOON, A. C., ANDERSON, J. D. & LIEBERMAN, M. Polyamines inhibit biosynthesis of ethylene in higher plant tissue and fruit protoplasts. **Plant Physiology, 68:** 453, 1981.
- ARNELLE, D. R. & STAMLER, J. S. NO<sup>+</sup>, NO<sup>•</sup>, and NO<sup>-</sup> donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. **Archives of Biochemistry and Biophysics, 318:** 279 – 285, 1995.
- BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **The American Journal of Medicine, 109:** 33 – 44, 2000.
- BEAR, M. F., CONNORS, B. W. & PARADISO, M. A. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. Editora Artmed, 2<sup>a</sup> edição, p. 150 – 153, 2002.
- BEYER, W. F. & FRIDOVICH, I. Characterization of a superoxide dismutase mimic prepared from desferrioxamin and MnO<sub>2</sub>. **Archives of Biochemistry and Biophysics, 271:** 149 – 156, 1989.

- BIEMOND, P., SWAAK, A. J. G., VAN EUK, H. G. & KOSTER, J. F. Superoxide dependent iron release from ferritin in inflammatory diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, **4**: 185 – 198, 1988.
- BOGGS, R. & DONOHUE, J. Spermine cooper (II) perchlorate. **Acta Crystallographica**, **B31**: 320 – 322, 1975.
- BOLANOS, J. & ALMEIDA, A. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1411**: 415 – 436, 1999.
- BURCHAM, P. C., KAMINSKAS, L. M., FONTAINE, F. R., PETERSEN, D. R. & PYKE, S. M. Aldehyde-sequestering drugs: tools for studying protein damage by lipid peroxidation products. **Toxicology**, **181 – 182**: 229 – 236, 2002.
- BURDON, R. H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. **Free Radical Biology and Medicine**, **18**: 775 – 794, 1995.
- CALINGASAN, N. Y., UCHIDA, K. & GIBSON, G. E. Protein-bound acrolein: a novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, **72**: 751 – 756, 1999.
- CAMPBELL, R. A., BARTOS, D., MORRIS, D. R., DAVES, G. D. Jr. & BARTOS, F. Advances in polyamine research. Editora Raven Press, New York, 1ª edição, p. 1 – 10, 1978.
- CASTILL, J., RAMA, R. & DAVALOS, A. Nitric oxide-related brain damage in acute ischemic stroke. **Stroke**, **31**: 852 – 857, 2000.
- CARTER, C. The neuropharmacology of polyamines. Editora Academic Press, London, 1ª Edição, p. 318, 1994.

- CELANO, P., BAYLIN, S. B. & CASERO Jr., R. A. Polyamines differentially modulate the transcription of growth-associated genes in human colon carcinoma cells. **Journal of Biological Chemistry**, **264**: 8922 – 8927, 1989.
- CHOI, D. W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. **Neuron**, **8**: 623 – 634, 1988.
- CLARKE, C. H. & SHANKEL, D. M. Antimutagenesis in microbial systems. **Bacteriological Reviews**, **39**: 33 – 53, 1975.
- COERT, B. A., ANDERSON, R. E. & MEYER, F. B. Exogenous spermine reduces ischemic damage in a model of focal cerebral ischemia in the rat. **Neuroscience Letters**, **282**: 5 – 8, 2000.
- COHEN, S. S. A guide to the polyamines. Editora Oxford University Press, Oxford, UK, 1ª edição, pp. 1 – 64, 1998.
- COTMAN, C. W., KAHLE, J. S., MILLER, S. E., ULAS, J. & BRIDGES, R. J. Excitatory amino acid neurotransmission. In **Psychopharmacology: The Forth Generation of Progress**. FLOYD, E., BLOOM and KUPFER, D. J. Editora Raven Press, New York, p. 75 – 85, 1995.
- CROSS, A. R. Inhibitors of the leukocyte superoxide generating oxidase: Mechanisms of action and methods for their elucidation. **Free Radical Biology and Medicine**, **8**: 71 – 93, 1990.
- DAWSON, V. L. & DAWSON, T. M. Free radicals and neuronal cell death. **Cell Death and Differentiation**, **3**: 71 – 78, 1996.
- DIEMER, N. H., VALENTE, E., BRUHN, T., BERG, M., JORGENSEN, M. B. & JOHANSEN, F. F. Glutamate receptor transmission and ischemic nerve cell



- damage: evidence for involvement of excitotoxic mechanisms. **Progress in Brain Research, 96:** 105 – 123, 1993.
- DROLET, G., DUMBROFF, E. B., LEGGE, R. L. & THOMPSON, J. E. Radical scavenging properties of polyamines. **Phytochemistry, 25:** 367 – 371, 1986.
- FAGE, D., VOLTZ, C., SCATTON, B. & CARTER, C. Selective release of spermine and spermidine from the rat striatum by *N*-methyl-D-aspartate receptor activation in vivo. **Journal of Neurochemistry, 58:** 2170 – 2175, 1992.
- FARBISZEWSKI, R., BIELAWSKI, K., BIELAWSKA, A & SOBANIEC, W. Spermine protects in vivo the antioxidant enzymes in transiently hypoperfused rat brain. **Acta Neurobiologiae Experimentalis, 55:** 253 – 258, 1995.
- FOSTER, A. C., VEZZANI, A., FRENCH, E. D. & SCHWARCZ, R. Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. **Neuroscience Letters, 48:** 273 – 278, 1984.
- FOSTER, A. C., WHETSELL, W. O. Jr., BIRD, E. D., SCHWARCZ, R. Quinolinic acid phosphoribosyltransferase in human and rat brain: activity in Huntington's disease and in quinolinate-lesioned rat striatum. **Brain Research, 336:** 207 – 214, 1985.
- FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. **Methods in Enzymology, 58:** 61 – 97, 1986.
- GARTHWAITE, G. & GARTHWAITE, J. Quinolinate mimics neurotoxic actions of *N*-methyl-D-aspartate in rat cerebellar slices. **Neuroscience Letters, 79:** 35 – 39, 1987.

- GARTHWAITE, J., GARTHWAITE, G., PALMER, R. M. J. & MONCADA, S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **European Journal of Pharmacology**, **172**: 413 – 416, 1989.
- GERNER, E. W., TOME, M. E., FRY, S. E. & BOWDEN, G. T. Inhibition of ionizing radiation recovery process in polyamine-depleted chinese hamster cells. **Cancer Research**, **48**: 4881 – 4885, 1988.
- GOGVADZE, V., WALTER, P. B. & AMES, B. N. The role of Fe<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation in the initiation of the mitochondrial permeability transition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **414**: 255 – 260, 2003.
- GRILO, M. A. Metabolism and function of polyamines. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, **17**: 943 – 948, 1985.
- HA, H. C., WOSTER, P. M., YAGER, J. D. & CASERO Jr., R. A. The role polyamines catabolism in polyamine analogue-induced programmed cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **94**: 11557 – 11562, 1997.
- HA, H. C., SIRISOMA, N. S., KUPPISAMY, P., ZWEIER, J. L., WOSTER, P. M. & CASERO Jr., R. A. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **95**: 11140 – 11145, 1998.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous systems. **Journal of Neurochemistry**, **59**: 1609 – 1623, 1992.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. Editora Oxford University Press, Oxford, UK, 3ª edição, 1999.

- HERMAN, M. D, REUVENY, E. & NARAHASHI, T. The effect of polyamines on voltage-activated calcium channels in mouse neuroblastoma cells. **Journal of Physiology**, **462**: 645 – 660, 1993.
- HEYES, M. P., WYLER, A., DEVINSKY, O., MARKEY, S., NADI, S. Quinolinic concentration in brain and cerebrospinal fluid of patients with intractable complex partial seizures. **Epilepsia**, **29**: 523 – 529, 1990.
- HEYES, M. P. The kynurenine pathway and neurological disease – Therapeutic strategies. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, **398**: 125 – 129, 1996.
- HU, J., MAHMOUD, M. I. & EL-FAKAHANY, E. E. Polyamines inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. **Neuroscience Letters**, **175**: 41 – 45, 1994.
- HUIE, R. E. & PADMAJA, S. The reaction of NO with superoxide. **Free Radical Research Communications**, **18**: 195 – 199, 1993.
- IENILE, R., MALECKA, B., PICCIURRO, V., NASO, A., PEDALE, S. & MACAIONE, S. Nitric oxide synthase in chick embryo retina during development. **FEBS Letters**, **379**: 82 – 84, 1996.
- ISHIKAWA, Y., SATOH, T., ENOKIDO, Y., NISHIO, C., IKEUCHI, T. & HATANAKA, H. Generation of reactive oxygen species, release of L-glutamate and activation of capsases are required for oxygen-induced apoptosis of embryonic hippocampal neurons in culture. **Brain Research**, **824**: 71 – 80, 1999.
- JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology and Medicine**, **9**: 515 – 540, 1990.

JOHNSON, T. D. Modulation of channel function by polyamines. **Trends in Pharmacological Sciences**, **17**: 22 - 27, 1996.

JOSEPHY, P. D. Molecular Toxicology, Editora Oxford University Press, New York, USA, 1997.

KENSLER, T. W., BUSH, D. M. & KOZUMBO, W. J. Inhibition of tumor promotion by a biomimetic superoxide dismutase. **Science**, **221**: 75 – 77, 1983.

KHAN, A., MEI, Y., WILSON, T. A proposed function for spermine and spermidine: protection of replicating DNA against damage by oxygen singlet. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **89**: 11426 – 11427, 1992a.

KHAN, A., MASCIIO, P., MEDEIROS, M. & WILSON, T. Spermine and spermidine protection of plasmid DNA against single-strand breaks induced by singlet oxygen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **89**: 11428 – 11430, 1992b.

KITADA, M., IGARASHI, K., HIROSE, S. & KITAGAWA, H. Inhibition by polyamines of lipid peroxide formation in rat liver microsomes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **87**: 388 – 394, 1979.

LAPIDUS, R. G. & SOKOLOVE, P. M. Inhibition by spermine of the inner membrane permeability transition of isolated rat heart mitochondria. **FEBS Letters**, **313**: 314 – 318, 1992.

LAPIN, I. P. Kynurenines and seizures. **Epilepsia**, **22**: 257 – 265, 1981.

- LAPIN, I. P., MIRZAEV, S. M., RYSOV, I. V., OXENKRUG, G. F. Anticonvulsant activity of melatonin against seizures induced by quinolinate, kainate, glutamate, NMDA and pentylenetetrazole in mice. **Journal of Pineal Research**, **24**: 215 – 218, 1998.
- LAUFFER, R. Iron and human diseases. Editora CRC Press, Boca Raton, 1992.
- LIPTON, S. A. & ROSENBERG, P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **New England Journal of Medicine**, **330**: 613 – 622, 1994.
- LIPTON, S. A. & STAMLER, J. S. Actions of redox-related congeners of nitric oxide at the NMDA receptor. **Neuropharmacology**, **33**: 1229 – 1233, 1994.
- LOVAAS, E. & CARLIN, G. Spermine: an anti-oxidant and anti-inflammatory agent. **Free Radical Biology & Medicine**, **11**: 455 – 461, 1991.
- LOOVAS, E. Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines. **Advances in Pharmacology**, **38**: 119 – 149, 1997.
- LOVINGER, D. M. Excitotoxicity and alcohol-related brain damage. **Alcoholism-Clinical and Experimental Research**, **17**: 19 – 27, 1993.
- MAEDA, K., KANEDA, H., WHETSELL, W. O. & TAMMINGA, C. A. Neurochemical and metabolic consequences of elevated cerebrospinal fluid quinolinic acid concentrations in rat brain. **Neuroscience Research**, **29**: 303 – 309, 1997.
- MANZONI, O., PREZEAU, L., MARIN, P., DESHAGER, S., BOCKAERT, J. & FAGNI, L. Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors. **Neuron**, **6**: 653 – 662, 1992.

- MARCHANT, P. A. & BLANKENSHIP, J. *N*<sup>1</sup>-acetylspermidine and *N*<sup>8</sup>-acetylspermidine in normal rat tissues and body fluids. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, **26**: 65 – 68, 1983.
- MAYER, M. L., BENEVISTE, J. M., PATNEAU, D. K. & VYKLICKY Jr., L. Pharmacology properties of NMDA receptors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **648**: 194 – 204, 1992.
- MEIER, B. & SIES, H. Superoxide release in fibroblasts by an NADPH oxidase is related to cell cycle and proliferation. **Free Radical Biology and Medicine**, **9**: 31, 1990.
- MILLER, D. M. & AUST, S. D. Studies of ascorbate-dependent, iron-catalyzed lipid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **271**: 113 – 119, 1989.
- MINOTTI, G. & AUST, S. D. The requirement for iron(III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. **Journal of Biological Chemistry**, **262**: 1098 – 1104, 1987.
- NANDAN, S. D. Effect of spermine on the gamma ray-induced genetic damage in human cell cultures and mouse bone marrow cells. In: **Kuroda, Y., Shankel, D. M., Shirasu, Y. eds.** 1988: 71.
- NICHOLLS, D. G. & BUDD, S. L. Mitochondria and neuronal glutamate excitotoxicity. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1366**: 97 – 112, 1998.
- NICOLETTI, F., BRUNO, V., COPANI, A., CASABONA, G. & KNOPFEL, F. Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of the therapy of neurodegenerative disorders? **Trends in Neurosciences**, **19**: 267 – 272, 1996.

- OZAWA, S., KAMIYA, H., TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology**, **54**: 581 – 618, 1998.
- PACKER, L., HIRAMATSU, M., YOSHIKAWA, T. Free radicals in brain physiology and disorders. Editora Academic Press, USA, 1ª edição, p. 474, 1996.
- PRAST, H. & PHILIPPOU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Progress in Neurobiology**, **64**: 51 – 68, 2001.
- PRYOR, W. A. & SQUADRITO, G. L. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. **American Journal of Physiology**, **268**: L699 – 722, 1995.
- PUNCHARD, N. A. & KELLY, F. J. Free radicals – a practical approach. Editora Oxford University Press, New York, USA, 1ª edição, p. 310, 1996.
- RANSOM, R. W. & STEC, N. L. Cooperative modulation of [<sup>3</sup>H]MK-801 binding to the *N*-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine and polyamines. **Journal of Neurochemistry**, **51**: 830 – 836, 1988.
- REYNOLDS, I. J. Arcaine uncovers dual interactions of polyamines with the *N*-methyl-D-aspartate receptor. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **255**: 1001 – 1007, 1990.
- RICE-EVANS, C. Free Radicals, Cell Damage and Disease. Editora Richelieu Press, London, Volume I, 1986.
- RICE-EVANS, C. Free Radicals, Disease States and Anti-Radical Intervention. Editora Richelieu Press, London, Volume VI, 1989.

- RICE-EVANS, C. & BURDON, R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. **Progress in Lipid Research**, **32**: 71 – 110, 1993.
- RÍOS, C. & SANTAMARÍA, A. Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. **Neurochemical Research**, **16**: 1139 – 1141, 1991.
- ROCK, D. M. & MACDONALD, R. L. Spermine and related polyamines produce a voltage-dependent reduction of *N*-methyl-D-aspartate receptor single-channel conductance. **Molecular Pharmacology**, **42**: 157 – 164, 1992.
- ROCK, D. M. & MACDONALD, R. L. Polyamine regulation of *N*-methyl-D-aspartate receptor channels. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, **35**: 463 – 482, 1995.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, E., CAMACHO, A., MALDONADO, P. D., PEDRAZA-CHAVERRÍ, J., SANTAMARÍA, D., GALVÁN-ARZATE, S. & SANTAMARÍA, A. Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. **Brain Research**, **858**: 436 – 439, 2000.
- ROSSATO, J. I., KETZER, L. A., CENTURIÃO, F. B., SILVA, S. J. N., LÜDTKE, D. S., ZENI, G., BRAGA, A. L., RUBIN, M. A. & ROCHA, J. B. T. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. **Neurochemical Research**, **27**: 297 – 303, 2002a.
- ROSSATO, J. I., ZENI, G., MELLO, C. F., RUBIN, M. A. & ROCHA, J. B. T. Ebselen blocks the quinolinic acid-induced production of thiobarbituric acid reactive species but does not prevent the behavioral alterations produced by intra-striatal quinolinic acid administration in the rat. **Neuroscience Letters**, **318**: 137 – 140, 2002b.



- RUBIN, M. A., BOEMO, R. L., JURACH, A., ROJAS, D. B., ZANOLLA, G. R., OBREGON, A. D. C., SOUZA, D. O. & MELLO, C. F. Intra-hippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. **Behavioural Pharmacology**, **11**: 57 – 61, 2000.
- RUBIN, M. A., STIEGEMEIER, J. A., VOLKWEIS, M. A., OLIVEIRA, D. M., FENILI, A. C., BOEMO, R. L., JURACH, A. & MELLO, C. F. Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. **European Journal of Pharmacology**, **423**: 35 – 39, 2001.
- SANTAMARÍA, A. & RÍOS, C. MK-801, a *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. **Neuroscience Letters**, **159**: 51 – 54, 1993.
- SANTAMARÍA, A., SALVATIERRA-SANCHEZ, R., VAZQUEZ-ROMAN, B., SANTIAGO-LOPEZ, D., VILLEDA-HERNANDEZ, J., GALVAN-ARZATES, S., JIMENEZ-CAPDEVILLE, M. E. & ALI, S. F. Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vitro and in vivo studies. **Journal of Neurochemistry**, **86**: 479 – 488, 2003.
- SCATTON, B., FROST, J., GEORGE, P., CARTER, C. & BENAVIDES, J. Present developments in NMDA receptor antagonists against cerebral ischaemia. **Current Opinion in Therapy and Pathology**, **4**: 523 – 545, 1991.
- SCATTON, B. The NMDA receptor complex. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, **7**: 389 – 400, 1993.
- SCHUBER, F. Influence of polyamines on membrane function. **Biochemical Journal**, **260**: 1 – 10, 1989.

- SCHWARCZ, R., WHETSELL, W. O. Jr., MANGANO, R. M. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. **Science**, **219**: 316 – 318, 1983.
- SEILER, N. Polyamine metabolism and function in brain. **Neurochemistry International**, **3**: 95 – 110, 1981.
- SEILER, N., BOLKENIUS, F. N. & KNÖDGEN, B. The influence of catabolic reactions on polyamine excretion. **Biochemical Journal**, **255**: 319 – 322, 1985.
- SEILER, N. Formation, catabolism and properties of the natural polyamines. In **Neuropharmacology of Polyamines**. Editora Academic Press, p. 26 – 36, 1994.
- SHAPIRO, H. K. Carbonyl-trapping therapeutic strategies. **American Journal of Therapy**, **5**: 323 – 353, 1998.
- SHARMA, K. N., PAL, V. & SAWHNEY, M. P. Mixed ligand complexes of nickel (II) and cadmium (II) with quinolinic acids as primary ligand and glycine and valine as second ligand. **Journal of Instrumental Chemistry**, **61**: 149, 1989.
- SHAW, G. G & PATEMAN, A. J. The regional distribution of polyamines spermidine and spermine in brain. **Journal of Neurochemistry**, **20**: 1225 – 1230, 1973.
- SHIBUKI, K. & OKADA, D. Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. **Nature**, **349**: 326 – 328, 1991.
- SIES, H. Antioxidants in disease: mechanisms and therapy. **Advances in Pharmacology**, **38**: entire volume, 1997.

- SINGH, L., OLES, R. & WOODRUFF, G. In vivo interaction of a polyamine with NMDA receptor. **European Journal of Pharmacology**, **180**: 391 – 392, 1990.
- SPITELLER, G. Are lipid peroxidation processes induced by changes in the cell wall structure and how are these processes connected with diseases? **Medical Hypotheses**, **60(1)**: 69 – 83, 2003.
- SPROSEN, T. S. & WOODRUFF, G. N. Polyamines potentiate NMDA induced whole-cell currents in cultured striatal neurons. **European Journal of Pharmacology**, **179**: 477 – 478, 1990.
- STÍPEK, S., STASTNY, F., PLÁTENÍK, J., CRKOVSKÁ, J. & ZIMA, T. The effect of quinolinate on rat brain lipid peroxidation is dependent on iron. **Neurochemistry International**, **30**: 233 – 237, 1997.
- STONE, T. W. & PERKINS, M. N. Quinolinic acid: a potent endogenous excitant amino acid receptors in CNS. **European Journal of Pharmacology**, **72**: 411 – 412, 1981.
- TABOR, C. W. & TABOR, H. Polyamines. **Annual Review of Biochemistry**, **53**: 749 – 790, 1984.
- TADOLINI, B. Polyamine inhibition of lipoperoxidation – The influence of polyamines on iron oxidation in the presence of compounds mimicking phospholipid polar heads. **Biochemical Journal**, **249**: 33 – 36, 1988.
- TIMBRELL, J. Principles of biochemical toxicology. Editora Taylor & Francis, London, 3<sup>a</sup> edição, 2000.

- UCHIDA, K. Current status of acrolein as a lipid peroxidation product. **Trends in Cardiovascular Medicine**, **9**: 109 – 113, 1999.
- ULAS, J., BRUNNER, L. C., GEDDES, J. W., CHOE, W. & COTMAN C. W. N-methyl-D-aspartate receptor complex in the hippocampus of elderly, normal individuals and those with Alzheimer's disease. **Neuroscience**, **49**: 45 – 61, 1992.
- WAGNER, J., CLAVERIE, N. & DANZIN, C. A rapid high-performance liquid chromatographic procedure for the simultaneous determination of methionine, ethionine, S-adenosylmethionine, and the natural polyamines in rat tissues. **Analytical Biochemistry**, **140**: 108 – 116, 1984.
- WEISINGER, H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. **Progress in Neurobiology**, **64**: 365 – 391, 2001.
- WILLIAMS, K., DAWSON, V. L., ROMANO, C., DICHTER, M. A. & MOLINOFF, P. B. Characterization of polyamines having agonist, antagonist and inverse agonist effects at the polyamine recognition site of the NMDA receptor. **Neuron**, **5**: 199 – 208, 1990.
- WILLIAMS, K., ROMANO, C., DICHTER, M. A. & MOLINOFF, P. B. Modulation of the NMDA receptor by polyamines. **Life Science**, **48**: 469 – 498, 1991.
- WILLIAMS, K. Interactions of polyamines with ion channels. **Biochemical Journal**, **325**: 289 – 297, 1997.
- WONG, E. H., KEMP, J. A., PRIESTLEY, T., KNIGHT, A. R., WOODRUFF, G. N. & IVERSEN, L. L. The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **83**: 7104 – 7108, 1986.

WORTHEN, D. R., GIBSON, D. A., ROGERS, D. T., BENCE, A. K., FU, M., LITTLETON, J. M. & CROOKS, P. A. Endogenous indoles as novel polyamine site ligands at the *N*-methyl-D-aspartate receptor complex. **Brain Research**, **890**: 343 – 346, 2001.

YONEDA, Y. & OGITA, K. Novel fourth binding sites of <sup>3</sup>[H]-spermidine within the NMDA receptor complex. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, **287**: 455 – 475, 1991.

ZALESKA, M. M. & FLOYD, R. A. Regional lipid peroxidation in rat brain *in vitro*: possible role of endogenous iron. **Neurochemical Research**, **10**: 397 – 410, 1985.

ZIGMOND, M., BLOOM, F. E., LANDIS, S. C., ROBERTS, J. L. & SQUIRE, L. R. *Fundamental Neuroscience*. Editora Academic Press, London, 1ª edição, 1999.

ZHU, S. G., MCGEER, E. G. & MCGEER, P. L. Effect of MK-801, kynurenate, glycine, dextrorphan and 4-acetylpyridine on striatal toxicity of quinolinate. **Brain Research**, **481**: 356 – 360, 1989.