Universidade de São Paulo
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Metabolismo de triptofano na vigência de choque
endotóxico induzido por LPS e hipertriptofanemia

Silene Migliorini

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Tit. Ana Campa

São Paulo
2010

Silene Migliorini

Metabolismo de triptofano na vigência de choque endotóxico
induzido por LPS e hipertriptofanemia

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Tit. Ana Campa
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

*A **Deus**, pela oportunidade de estar aqui
e por estar sempre presente em minha vida,
guiando os meus passos
e dando forças para superar os obstáculos.*

*Ao meu esposo **Uendel**,
pelo constante apoio e incentivo
para a realização desse projeto.*

*Ao meu filho amado, esperado e desejado **Vinícius**,
um anjo que Deus me enviou.
Amor incondicional.*

*A **minha família** pelo carinho, incentivo,
apoio e torcida para a realização desse projeto.*

*A minha chefe e orientadora,
profa. Ana Campa,
pela oportunidade, paciência e
auxílio em todas as horas.*

AGRADECIMENTOS

À **Amanda** e **Karina**, amigas “hematológicas”, que me ajudaram muito no manuseio com os animais.

Às minhas queridas amigas **Fofinha**, **Fabi** e **Mê** pelo carinho e amizade sempre.

Aos meus colegas de laboratório, **Andressita**, **Carolzinha**, **Carol**, **Edson**, **Fabíola**, **Fabíola 2**, **Franciele**, **Mário**, **Melissa**, **Renan**, **Renata**, **Talita** e **Wilton** pela convivência maravilhosa e apoio nas horas difíceis.

À **Sabrina** e **Silvana** pela amizade e ajuda constante durante a realização e concretização deste projeto.

Ao **Felipe “Massas”** pelo apoio técnico.

A todos os **funcionários** do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Ao **prof. Clovis** e **sua equipe**, da UFRGS, pela contribuição dada a este trabalho.

A todos o meu **MUITO OBRIGADO!!!!**

*Sonhe com aquilo que você quiser.
seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida e nela só
se tem uma chance de fazer aquilo que se quer.*

*Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.*

*As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades
que aparecem em seus caminhos.*

*A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem a importância
das pessoas que passam por suas vidas.*

Clarice Lispector

ÍNDICE

1	LISTA DE ABREVIATURAS	11
2	RESUMO	13
3	ABSTRACT	15
4	INTRODUÇÃO	16
5	REVISAO BIBLIOGRÁFICA	17
5.1	TRIPTOFANO E SEUS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO	17
5.2	HIPERTRIPTOFANEMIA	22
5.3	TRIPTOFANO 2,3 DIOXIGENASE	23
5.4	INDOLAMINA 2,3 DIOXIGENASE	26
5.5	CAPTAÇÃO DE TRP PELO SNC	29
5.6	TOXICIDADE INDUZIDA POR TRP	31
5.7	CHOQUE ENDOTÓXICO	32
5.8	ANATOMIA DO SNC	33
6	OBJETIVOS	36
6.1	OBJETIVO GERAL	36
6.1.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
7	MATERIAIS E MÉTODOS	37
7.1	REAGENTES	37
7.2	EQUIPAMENTOS	37
7.3	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	38
7.3.1	Animais	38
7.3.2	Grupo experimental	38
7.3.3	Avaliação da resposta animal frente ao processo séptico	39
7.3.4	Tratamento com acetona	39
7.3.5	Identificação e isolamento de produtos de oxidação da MEL	40
7.3.6	Ensaio de atividade de IDO	41
7.3.7	Western blotting de IDO e TDO	42
7.3.8	ELISA	42
7.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
8	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
8.1	TRP E QUIN SÉRICOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE TRP E LPS	45
8.2	TRP E QUIN EM REGIÕES DO SNC APÓS ADMINISTRAÇÃO DE TRP E LPS	50
9	CONCLUSÃO	56
10	REFERÊNCIAS	59
11	ANEXOS	68

1 LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – acetonitrila

AFMK – *N*1-acetil-*N*2-formil-5-metoxiquinuramina

AMK – *N*1-acetil-5-metoxiquinuramina

BHE – barreira hemato encefálica

DC – células dendríticas

ERO – espécies reativa de oxigênio

HIV – human immunodeficiency virus (vírus da imunodeficiência humana)

HPLC – high performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)

5-HT – serotonina

IAA – ácido indolacético

IDO – indolamina 2,3 dioxigenase

IDO 2 - indolamina 2,3 dioxigenase 2

IFN γ - Interferon gama

IL – interleucina

IL-1 β - interleucina 1 β

ILA – ácido indol-lático

LC-MS – cromatografia líquida de alta performance acoplada a um espectômetro de massas

LPS – lipopolissacarídeo

MEL – melatonina

1-MT – 1 metil-triptofano

NAD⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NFK – *N*-formilquinurenina

NMDA – N-metil D- Aspartato

PBS – tampão fosfato salina

QUIN/KYN – quinurenina

SME – síndrome da mialgia eosinofílica

SNC – sistema nervoso central

TDO – triptofano 2,3 dioxigenase

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

TPH - enzima triptofano hidroxilase

Treg – linfócitos T reguladores

TRP – triptofano

UV – ultravioleta

VIS – visível

2 RESUMO

Triptofano (TRP), um amino ácido essencial, é metabolizado por duas vias principais, a via das quinureninas e a via serotoninérgica. Em ambas as vias há a possibilidade de formação de compostos ativos no sistema imune que se caracterizam pelas ações imunossupressoras e indutoras de tolerância. Na via serotoninérgica há a formação de serotonina (5-HT) e em alguns tecidos de melatonina (MEL). Este composto pode ainda ser oxidado por ação de peroxidases aos seus produtos de abertura de anel indólico o AFMK (*N*¹-acetil-*n*²-formil-5-metoxiquinuramina) e AMK (*N*¹-acetil-5-metoxiquinuramina). Já na via das quinureninas, o TRP é diretamente metabolizado à *N*-formilquinurenina (NFK) e este é rapidamente deformilado a quinurenina (QUIN). Neste projeto avaliamos qual o efeito do choque endotóxico induzido por injeção endovenosa de LPS (1 mg/kg) sobre a biodisponibilidade de TRP e formação de seu metabólito QUIN. Este estudo foi realizado em condições controle e na vigência de sobrecarga de TRP (administração subcutânea de 0,8 mg/kg). Utilizamos ratos machos Wistar com 30 dias separados em quatro grupos: GI (controle), GII (LPS), GIII (TRP) e GIV (TRP+LPS). TRP (0,8 mg/Kg) foi injetado por via subcutânea nos tempos 0 e 2 horas. Quando injetado, LPS (1 mg/kg) foi administrado por via intravenosa no tempo 2 horas. Após 1 hora da última administração, sangue e cérebro foram coletados. O cérebro foi seccionado em três regiões: cerebelo, córtex e mesencéfalo, os quais foram processados para obtenção de homogenatos. Tanto os homogenatos quanto o soro foram tratados com acetona para extração de TRP e seus metabólitos. A análise destes compostos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A administração de TRP elevou significativamente a sua concentração no soro e no SNC. Quando da administração de LPS no grupo que já havia recebido sobrecarga de TRP (GIV) houve uma marcada elevação de TRP e de QUIN séricos e das regiões do SNC, especialmente na região do córtex. Concluimos que na vigência de

choque endotóxico há um aumento da biodisponibilidade de TRP, tanto no soro como no SNC e que há um aumento da metabolização deste pela rota das quinureninas, possivelmente via IDO. Estes resultados contribuem para a compreensão da toxicidade de TRP, especialmente relevante no caso em que haja um choque endotóxico concomitante e evidencia o córtex como uma região mais susceptível para os efeitos tóxicos do TRP.

Palavras-chaves: Triptofano(TRP). Quinurenina (QUIN). Indolamina 2,3 dioxigenase(IDO)

3 ABSTRACT

Tryptophan (TRP) is an essential amino acid, metabolized by two main paths; the kynurenine and the serotonergic pathways. In both, there is the possibility of generation of biologic active compounds, especially on the immune system leading to immunosuppression and tolerance. In the serotonergic path there is the formation of serotonin (5-HT) and in some tissues of melatonin (MEL). The latter can be oxidized by the action of peroxidases to its indole ring opening product AFMK (*N*¹-acetyl-*n*²-formyl-5-methoxykynuramine) and AMK (*N*¹-acethyl-5-methoxykynuramine). In the kynurenine path, TRP is metabolized to *N*-formylkynurenine (NFK) that is deformilated to kynurenine (KYN). In this study we evaluated the effect of a endotoxic shock induced by an intravenous injection of LPS (1 mg/kg) on the bioavailability of TRP and formation of KYN. This study was carried out in control conditions and on TRP overload (subcutaneous administration of 0,8 mg/Kg). One month old male Wistar rats were divide in four groups: GI(control), GII(LPS), GIII(TRP) and GIV (TRP+LPS). TRP (0,8 mg/kg) was subcutaneously injected at zero and 2h times. When injected, LPS (1mg/kg) was intravenously administered at 2 h. After one hour from the last administration, blood and brain were collected. Brain is separated in cerebellum, midbrain and cortex and was lysed for the preparation of homogenates. Both, serum and homogenates were extracted in acetone; TRP and KYN were analyzed by HPLC. TRP overload caused a significant increase in its concentration in serum and brain. When LPS was administered in conjunction with TRP overload (GIV) there was a remarkable increase in TRP and KYN in serum and brain, especially in cortex. Our conclusion is that in the bioavailability of TRP, in serum and in brain, and its metabolization to kynurenine is increased by inflammation. IDO is probably involved in this condition. Our results contribute to the knowledge of TRP toxicity, particularly with a concomitant inflammation and demonstrate the cortex as a region of more susceptibility to TRP toxicity.

Key words: Tryptophan (TRP). Kynurenine (KYN). Indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO).

4 INTRODUÇÃO

O triptofano (TRP), um aminoácido essencial, é metabolizado por duas principais vias, a via das quinureninas e a via serotoninérgica. A via das quinureninas leva a formação de N-formilquinurenina (NFK) e quinurenina (QUIN) e esse por consequência pode ser metabolizado a outros compostos como ácido quinolínico e ácido quinurênico que são compostos neuroativos. A via serotoninérgica leva a formação de serotonina (5HT), um neurotransmissor e em alguns tecidos a melatonina (MEL), um hormônio. Ambas as vias há a formação de compostos com ação sobre o sistema imune que se caracterizam pelas ações imunossupressoras e indutoras de tolerância. Este projeto avaliou a biodisponibilidade de TRP e de quinurenina em soro e cérebro de ratos em modelo de choque endotóxico ocasionado por 1,0 mg/kg de lipopolissacarídeo (LPS) endovenoso. O estudo foi ainda realizado em condições controle e na vigência de sobrecarga de TRP (administração subcutânea de 0,8 mg/kg). Os resultados nos ajudam a compreender a mobilização de TRP na vigência do choque endotóxico e possíveis sítios preferenciais de metabolização de TRP no SNC.

5 REVISAO BIBLIOGRÁFICA

5.1 *Triptofano e seus produtos de oxidação*

TRP é um aminoácido essencial cuja obtenção se dá exclusivamente através de dieta alimentar. Este é um dos principais compostos indólicos encontrados no organismo, por ser o primeiro composto de uma cascata de reações que levam a formação de outros compostos indólicos e produtos de oxidação biologicamente ativos (**Figura 1**). A alteração da concentração sérica de TRP está associado a doenças. O seu aumento está associado a hipertriptofanemia. Já a diminuição de TRP está associada a doenças como tumores e depressão (1 - 3). Devido à diminuição da sua concentração em determinados sítios, o TRP está associado ainda ao processo de imunomodulação, como a imunossupressão de linfócitos T e um dos mecanismos envolvidos é a ativação da quinase GCN2, que resulta na inibição da ativação e proliferação celular de linfócitos T (4). O TRP ainda está associado ao processo imuno “escape” de tumores, uma vez que certos tipos de tumores tem a capacidade de expressar uma das enzimas responsáveis pelo catabolismo desse aminoácido, ou seja, a indolamina 2,3 dioxigenase (IDO). É também reconhecido que a depleção desse composto, em sítios infecciosos, controla o crescimento de patógenos e a infecção é melhor controlada (5). TRP também está associado a distúrbios neurológicos como demonstra um trabalho que relaciona a diminuição de concentração de TRP sérico em paciente com depressão intensa (6, 7) e a apresentação de sintomas de depressão em apenas algumas horas com depleção de TRP no cérebro (8). Esses fatos mostram a ação desse aminoácido em diversas funções, entretanto, a depleção sozinha de TRP não é capaz de explicar todas as ações envolvendo as múltiplas ações do TRP e os efeitos decorrentes de sua depleção. Isto é verdade especialmente para o processo de tolerância, modulação de células do sistema

imune e sintomas encontrados em distúrbios psicológicos.

Figura 1 - Vias de metabolização do aminoácido TRP.

A principal via de metabolização de TRP é a via das quinureninas. Nessa via, 99% do TRP ingerido é metabolizado a compostos coletivamente chamados de quinureninas (9). Até os anos 80, o interesse nessa via estava centrado na síntese de nicotinamida (niacinamida, vitamina B3), um precursor da síntese do cofator de reações nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+). Logo foram sendo descritos intermediários desta via, e para estes também foram identificadas funções biológicas. A via das quinureninas apresenta várias ramificações sendo a principal delas gerando ácido quinolínico e nicotinamida. Os outros braços dessa via geram o ácido quinurênico e o ácido xanturênico (**Figura 2**). NFK é o primeiro produto de oxidação TRP, e as enzimas que são o primeiro e

passo limitante desta via são as triptofano 2,3 dioxigenase (TDO), IDO e IDO-2. TDO é uma dioxigenase expressa quase que exclusivamente pelo fígado e é responsável pelos níveis séricos de TRP e QUIN (10). A IDO e IDO-2 são enzimas expressas em diversos outros tecidos e suas ações específicas serão comentadas mais adiante.

Figura 2 – Metabolização de TRP pela via das quinureninas.

É na via das quinureninas que se encontram os compostos que auxiliam no processo de tolerância, de imunomodulação e das alterações psicológicas descritas para o TRP. O tratamento de camundongos com ácido 3-hidroxi-antranílico e ácido quinolínico levaram a depleção de um subtipo determinado de timócitos (11) e a presença de QUIN e 3-hidroxiquinurenina, intermediários da via das quinureninas, são capazes de induzir linfócitos T reguladores (Tregs) (12) e células dendríticas (DC) com ação supressora (13).

Relacionado a alterações psicológicas, alguns dos intermediários dessa via são neuroativos. O ácido quinolínico é um agonista de receptores de *N*-metil-D-aspartato (NMDA), produzindo excitação (14) e lesões nos axônios de células neurais (15). Apesar do ácido quinolínico ser menos potente do que NMDA ele é similar a uma neurotoxina, possivelmente porque produz danos, devido a sua atuação conjunta na ativação de receptores NMDA, na disfunção mitocondrial (16, 17), e no aumento de geração de radicais livres (18, 19). A concentração basal desse composto raramente excede 1 μ M, mas em resposta a toxinas bacterianas ela aumenta cerca de 246 vezes no cérebro e 66 vezes no espaço extracelular (20, 21). Já o ácido quinurênico foi o primeiro a mostrar a ação de bloquear receptores glutamato (22) e ser antagonista de receptores que ligam ao sítio do glutamato e receptores que se ligam ao sítio alostérico de glicina de NMDA (23, 24). Há indícios que a atuação desse ácido em sítios indefinidos do cérebro e prevenção da morte neuronal induzida por glutamato é realizada pelas suas concentrações fisiológicas (25). O aumento dos níveis do ácido quinurênico está ainda associado à supressão neuronal em resposta a nicotina *in vivo* (26). O composto 3-hidroxiquinurenina é neurotóxico pela sua conversão a quinoniminas e espécies reativas de oxigênio (ERO), agentes que iniciam a apoptose (27,28). Alguns dos danos gerados por esse composto pode ser devido ao seu metabolismo para o ácido 3-hidroxi-antranílico que pode se auto-oxidar formando $O_2^{\cdot-}$.

O aumento de metabolização de TRP pela via das quinureninas tem como consequência à diminuição da concentração de serotonina (5-HT) que, dependendo do tecido e enzimas disponíveis, será convertida em MEL. Sendo assim, a baixa disponibilidade de TRP, diminui a síntese de 5-HT e consequentemente de MEL. A concentração de MEL no plasma é baixa durante o dia (1-6 pg/mL) e alta à noite (200-300 pg/mL), o que define um ritmo diário para MEL (29).

Além de sua metabolização hepática, MEL pode ser oxidada a AFMK, seguida de deformilação formando AMK, por ação da enzima formamidase, assim como ocorre no metabolismo do TRP (30). Nosso grupo foi o primeiro a mostrar que MEL pode ser oxidada a AFMK pela ação da mieloperoxidase, enzima presente em neutrófilos e monócitos/macrófagos (**Figura 3**) (31) .

Figura 3 - Oxidação de Melatonina através da ação da mieloperoxidase.

AFMK e AMK, além de apresentar funções muito semelhantes a MEL, tem atividades muitas vezes superiores a da própria MEL (32-35). De acordo com outro trabalho de Silva, S.O. e colaboradores, MEL é metabolizada ao AFMK em sítios inflamatórios dada a presença deste último em altas concentrações no líquido de pacientes com meningite viral. A coincidência da presença de AFMK e a diminuição de parâmetros inflamatórios como celularidade, concentrações de proteínas e citocinas pró-inflamatórias dão indícios da ação imunomodulatória desse composto (36). Nosso grupo ainda demonstrou o efeito inibitório de AFMK e AMK sobre a secreção de citocinas (IFN- γ , IL-2) e proliferação de linfócitos T humanos previamente ativados, sugerindo que parte dos efeitos biológicos descritos para MEL pode ser intermediado por seus produtos de oxidação (37).

5.2 Hipertriptofanemia

Os episódios de hipertriptofanemia são raros e estão relacionados a defeitos congênitos no metabolismo de TRP (38). Há pelo menos 12 relatos de pacientes com defeitos no catabolismo de TRP (39). A hipertriptofanemia provavelmente é causada pelo bloqueio de uma das vias, TDO ou IDO, ou então de algumas das etapas posteriores de degradação do triptofano. Clinicamente, os pacientes acometidos apresentam retardamento mental moderado com respostas afetivas exageradas, mudanças periódicas de humor e comportamento hipersexual aparente (38).

Durante a hipertriptofanemia os níveis de TRP são 10 vezes maior e a excreção urinária de ácidos indólicos é 100 vezes maior que o normal. A excreção maciça do TRP e derivados indólicos, sugerem que grandes quantidades de TRP foram metabolizadas por transaminação.

Outras doenças neurológicas são ligadas com anormalidades no mecanismo de TRP, mas a relação entre causa e efeito não é clara. Entretanto, os pacientes que têm um defeito na degradação de TRP podem apresentar características clínicas da deficiência de niacina, tais como erupções cutâneas fotossensíveis, ataxia e subnormalidade normal (40).

Além da deficiência genética, há relatos de ingestão aumentada de triptofano e consequente toxicidade (ver item 5.6, p31). Estes aspectos parecem relevantes uma vez que, se por um lado é reconhecido o impacto de um balanço negativo de TRP, não só para a síntese de proteínas, mas também sobre a concentração de metabólitos do TRP, como serotonina, ácido picolínico, niacina e MEL, também se reconhece a neurotoxicidade causada pela hipertriptofanemia.

5.3 Tryptofano 2,3 dioxigenase

A TDO é uma hemoproteína tetramérica cuja descoberta e caracterização foram realizadas em 1936 e 1955 respectivamente (41,42). A TDO tem massa de aproximadamente 190 kDa em eucariotos e 120 kDa em procariotos e o seu grupo prostético é a protoporfirina IX.

Estudos estruturais de TDO isolada de *Xanthomonas campestris* (*X. campestris*) demonstraram que ela é construída por 4 monômeros idênticos e cada monômero apresenta 12 α hélices e nenhuma folha β . Estes monômeros formam um tetrâmero de área de superfície de aproximadamente 4.500 Å². As hélices α B e α C localizam-se na interface entre dois monômeros e esta região apresenta praticamente só resíduos hidrofóbicos. Os segmentos N terminais de dois monômeros são trocados quando formam o dímero. Este rearranjo é importante para a catálise de TDO por que vários resíduos nestes segmentos são parte de um sítio de ligação para o TRP no sítio ativo (43) (**Figura 4**). Cada tetrâmero apresenta ainda dois grupos heme.

Figura 4 - Estrutura de TDO. Os quatro monômeros estão apresentados em diferentes cores, azul, verde, vermelho e violeta. Retirado de Forouhar F. e colaboradores 2007 (43).

Através dos resultados da cristalografia da enzima é possível verificar que o substrato desta enzima, L-tryptofano deve ficar localizado em uma região sobre a face

distal do heme interagindo com resíduos nas hélices α B e α D e com os *loops* α D- α E e α J- α K. O grupo carboxila do TRP interage com a cadeia lateral da Arg117 e também forma ponte de hidrogênio com a hidroxila da Tyr113. O íon amônia do TRP é reconhecido pela cadeia lateral 7-propionato do grupo heme e também forma ponte de hidrogênio com a cadeia lateral hidroxila de Thr254. O anel indólico fica localizado a aproximadamente 3,5 Å acima e perpendicular ao heme e se mantém no local por interações de van der Waals com as cadeias laterais de Phe51 entre outros resíduos hidrofóbicos (43).

A TDO catalisa o primeiro e passo limitante da via das quinureninas, oxidando o TRP ao seu produto de abertura de anel indólico o NFK (44). Apesar de TDO e IDO compartilharem da mesma ação bioquímica elas apresentam apenas 10% de identidade entre as sequências gênicas. Ainda assim comparando as estruturas cristalinas de TDO de *X. campestris* e IDO humana verifica-se que a região do sítio ativo é conservada entre as duas enzimas somente havendo a alteração do resíduo His55 na TDO para a Ser167 na IDO (45).

O substrato desta enzima é capaz ainda de reagir com outros compostos como o 5-fluortriptofano e o 6-fluortriptofano (43,46). Por esta enzima apresentar baixa abrangência de substratos, diversos compostos de estruturas semelhantes passam a ser considerados inibidores do mesmo como é o caso dos compostos indolaminas. Os compostos triptaminas, 5-hidroxitriptofano e melatonina são considerados inibidores competitivos de TDO. Ela ainda sofre a inibição do produto final da via das quinureninas, a forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato (NADPH) e seus produtos análogos (47). Interessante é o fato de que tanto TDO quanto IDO não toleram substratos com alteração nem no carbono α nem no amônio α , locais importantes para as pontes de hidrogênio que estabilizam o substrato no sítio ativo.

A TDO é encontrada em vários eucariotos e procariotos dentre eles coelhos (48),

camundongos (49), insetos (50), bactérias (43,51) e leveduras (51). Em humanos, esta enzima foi primeiramente caracterizada no fígado, e recentemente foi descrita em pele e SNC como em astrócitos (52). Em camundongo vem sendo demonstrada a expressão de TDO em hipocampo, cerebelo, estriato e tronco do cérebro (53).

Foi verificado que em camundongos *knockout* há um aumento nos níveis séricos de TRP, QUIN e de 5-HIAA e também um aumento dos níveis de TRP, 5-HT e 5-HIAA no hipocampo e mesencéfalo. Foi demonstrado ainda que esta enzima auxilia na modulação da ansiedade e também na neurogênese adulta (54). Um outro estudo relaciona o aumento da relação QUIN/TRP em pacientes psicóticos em relação ao controle. Eles entenderam ainda que este aumento não está relacionado a IDO, uma vez que não houve diferença na concentração de IFN- γ entre os grupos de paciente e controle. Alguns estudos demonstraram um aumento na atividade e expressão de TDO em córtex anterior de pacientes com esquizofrenia e transtorno bipolar (55).

A TDO é induzida por hormônios glicocorticóides liberados em situações de estresse (56,57). O próprio substrato, o L-TRP pode também aumentar a atividade e a expressão desta enzima quando presente por ativar sítios alostéricos distintos (58). Alguns medicamentos antidepressivos são capazes de inibir a atividade de TDO (59-63). Esta ação auxilia no tratamento de pacientes depressivos por diminuir o consumo de TRP, aumentando a sua disponibilidade e consequentemente aumentando a síntese de 5-HT, um importante composto associado à depressão.

5.4 Indolamina 2,3 dioxigenase

A enzima indolamina 2,3 dioxigenase (IDO) é uma hemoproteína monomérica localizada no cromossomo 8 p12-p11. Ela possui a protoporfirina IX como grupo prostético e seu peso é de aproximadamente 42 kDa. Apesar de uma enzima descoberta há quase 40 anos (64), sua estrutura terciária foi desvendada somente em 2006 por Sugimoto, H. e colaboradores (65). A enzima possui dois domínios distintos (maior e menor), sendo que o maior domínio é helicoidal e apresenta 13 α -hélices e duas 3_{10} hélices e o menor domínio é composto de 6 α -hélices, 2 folhas β curtas e três 3_{10} hélices (**Figura 5**). Com relação ao grupo heme, o lado proximal é ocupado somente por cadeias laterais do maior domínio. Estudos mutagênicos prévios (66) sugeriram que o Asp274 é o resíduo chave para a reação catalítica de IDO. O ambiente distal do heme, que é um sítio de coordenação de ferro heme para os seis ligantes externos, é compreendido na combinação do menor domínio, do maior domínio e do *loop* de conexão desses dois domínios. Devido ao oxigênio molecular ligar-se a esse sítio, as características estruturais desse ambiente distal do heme pode ser o responsável pela reação dioxigenásica da IDO.

Figura 5 - Estrutura de IDO. Em azul escuro está o domínio menor e em verde está o domínio maior. Cadeia de ligação está em azul ciano. O loop longo de conexão entre os dois domínios está em vermelho. Retirado de Hiroshi Sugimoto e colaboradores 2006 (65).

A IDO catalisa a oxidação de TRP a NFK. Apesar de não apresentar uma especificidade de substrato, como a TDO que catalisa somente a oxidação de L -TRP, a IDO apresenta uma preferência pela L -TRP, entretanto outros substratos já foram descritos como a D -TRP e a 5-metoxi- D,L -TRP (66). Estudos mecanísticos da reação de L -TRP com IDO mostraram que a enzima encontra-se naturalmente na forma férrica (Fe^{+3}), forma não ativa, e é necessário um agente redutor para iniciar e manter a atividade enzimática. *In vitro* o sistema azul de metileno/ascorbato (AM/ASC) (67-69) é amplamente utilizado apresentando bons resultados. Inicialmente considerou-se que esse sistema geraria $O_2^{\cdot -}$ e esse composto reduziria o grupo férrico da IDO, tornando-a cataliticamente ativa (70). Entretanto, trabalhos seguintes questionaram a ação de $O_2^{\cdot -}$, uma vez que células e tecidos teriam uma baixa concentração dessa molécula o que seria insuficiente para a ativação de IDO e principalmente pela baixa interferência da enzima superóxido dismutase (SOD), enzima que dismuta $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 , na formação de QUIN. Recentemente um estudo apresentou uma nova hipótese de agente redutor de IDO, o sistema citocromo b5/citocromo P450 redutase na presença de sistema regenerador de NADPH (NADPH/glucose 6 fosfato/ glicose 6 fosfato desidrogenase) que poderia atuar em ambos ensaios (*in vitro* e *in vivo*) (71). Uma vez que a IDO- Fe^{+3} é ativada a IDO- Fe^{+2} , o sistema dioxigenásico se mantém as custas de oxigênio molecular (O_2) (**Figura 6**).

Figura 6 - Esquema resumido do ciclo dioxigenásico da IDO.

A oxidação de TRP se dá através da inserção de 2 oxigênios no seu anel pirrólico (72). Terentis, A.C., e colaboradores mostrou que o mecanismo de clivagem do anel indólico envolvia a abstração de próton pelo O_2 ligado ao ferro, seguido de adição eletrofílica do dioxigênio, atacando a dupla ligação entre os carbonos C2 e C3 do anel indólico (73). Esse mecanismo foi discutido por Sugimoto, H. e colaboradores como sendo plausível, mesmo após a descoberta da estrutura cristalina de IDO (**Figura 7**) (65).

Figura 7 – Esquema mostrando a interação de IDO com TRP, levando a clivagem do anel indólico. (modificado de Sugimoto, H. E colaboradores. 2006 (65))

Por apresentar um grupo heme, a IDO também apresenta atividade peroxidásica (74). Esse fato foi demonstrado por Ferry, G. e colaboradores (75), com IDO na presença de H_2O_2 . Nessas condições a atividade dioxigenásica não ocorre, e a degradação de TRP não é realizada. Quando a atividade dioxigenásica está presente, a ação peroxidásica é inibida e o substrato da IDO-peroxidase não é oxidado. Esse fato talvez auxilie na explicação da inibição da ação dioxigenásica de IDO na presença de H_2O_2 , mesmo em concentrações relativamente baixas ($10 \mu M$) (76).

A IDO é expressa em placenta (77), pulmão (78), intestino delgado e grosso, cólon (79), rim (80), e cérebro (81) de maneira constitutiva ou induzida. Além disso, a sua expressão é induzível por IFN- γ em DC, monócitos, macrófagos, eosinófilos, células epiteliais, fibroblastos, músculo vascular liso, células endoteliais e algumas linhagens de tumores. Essa diversidade de tecidos e células que expressam IDO demonstra a importância dessa via em sítios localizados.

Uma vez que a IDO é uma das enzimas envolvidas no primeiro e passo limitante da via das quinureninas e os compostos gerados através desta via são compostos neuroativos como já descritos anteriormente, esta enzima está envolvida ainda em doenças como a depressão, demência causada pelo vírus HIV (82), malária (83) e injúria cerebral isquêmica (84).

5.5 *Captação de TRP pelo SNC*

O metabolismo de TRP produz diversas moléculas biologicamente ativas, incluindo muitos neuromoduladores importantes para a função do sistema nervoso central (SNC). 90% de TRP total no plasma se liga à albumina, formando um complexo que não pode cruzar a barreira hemato-encefálica (BHE) e o restante circula na forma livre, a qual está disponível para ultrapassar a BHE (85). A concentração plasmática de ácidos graxos livres é o principal determinante na proporção de TRP livre e ligado à albumina. Fatores exógenos, como fármacos e drogas, por exemplo, os benzodiazepínicos, também têm essa ação.

Aminoácidos competem pelo sistema de transporte ativo compartilhado entre eles para sua entrada no SNC através da BHE (86). Outros aminoácidos neutros, tais como fenilalanina, leucina e metionina, são transportados para o cérebro pelo mesmo transportador.

Apesar de ser ainda uma questão em debate se a concentração total ou livre de TRP seja o determinante mais crítico para sua captação pelo cérebro, existem evidências convincentes sugerindo que o aumento da dissociação do TRP da albumina no microambiente vascular cerebral seja um fator importante (87).

O transporte de TRP através da BHE e dentro do fluido extracelular do SNC desempenha um papel importante na regulação do metabolismo de TRP cerebral. A ativação do sistema nervoso simpático parece desempenhar um papel significativo na regulação da disponibilidade de TRP para o cérebro. Essa ativação contribui para o aumento da concentração de TRP cerebral após estresse e fatores imunológicos em animais experimentais (88). Alguns estudos têm sugerido que pode haver uma influência direta da estimulação do sistema nervoso simpático no transportador que capta o TRP dentro do SNC (89). Uma vez que TRP tenha ultrapassado a BHE, ele está disponível para a captação em células do SNC para a utilização em várias vias metabólicas (87).

(Figura 8).

Figura 8 - Resumo do metabolismo de TRP no sistema nervoso central (adaptado de Ruddick, J.P. e colaboradores (87)).

5.6 Toxicidade induzida por TRP

Apesar da reconhecida importância do TRP na síntese de proteínas e na produção de mediadores, a ingestão excessiva de TRP tem sido associada com uma síndrome multisistêmica, conhecida como síndrome da mialgia eosinofílica (SME) (88).

Embora estudos epidemiológicos indicassem o envolvimento do contaminante etilideno-bis-triptofano na SME, alterações no metabolismo do TRP tem sido descritos em outras síndromes clínicas similares tais como fibrose tecidual, síndrome carcinóide, escleroderma e fascitis eosinofílica (89).

Ratos alimentados com altas concentrações de TRP e que tem seu ingresso aumentado no SNC mostram sinais de indução da via das quinureninas e dano tecidual. TRP é usado como complemento alimentar e seu excesso é normalmente degradado pela TDO hepática. Além da indústria alimentícia, a utilização de TRP tem sido divulgada no tratamento popular de insônia, depressão e ansiedade. Nestes casos, e sem prescrição médica, foram sugeridas doses excessivas de TRP (da ordem de 15 gramas) (89).

O efeito tóxico de doses excessivas de TRP tem sido mostrado em estudos animais nos quais se descreve além do aumento de processos fibróticos e produção aumentada de TNF- α . A dose cumulativa e duração da exposição ao TRP são importantes para a intensidade dos danos. A toxicidade do TRP parece bem relacionada à síntese de compostos tóxicos advindos da via das quinureninas. O ácido quinolínico e 3-hidroxiquinurenina respectivamente agonista de *N*-metil-D-aspartato e participante da geração de radicais livres estão envolvidos no dano de neurônios. O ácido quinolínico está implicado em desordens neurodegenerativas, como a demência em decorrência da AIDS e doença de Huntington. Estes intermediários são possíveis candidatos ao desencadeamento de eventos tóxicos também fora do SNC (90).

Além de doses cumulativas de TRP, um quadro similar de toxicidade de TRP é visto em pacientes que sofrem hemodiálise. A dificuldade de excreção dos produtos de metabolismo do TRP em pacientes renais é considerada responsável por alguns dos sintomas da síndrome urêmica tais como distúrbios neurológicos, aumento da susceptibilidade a infecções entre outros (91).

5.7 Choque endotóxico

O choque endotóxico ou choque séptico é uma resposta sistêmica que ocorre durante uma infecção severa caracterizada por febre, taquicardia, taquipneia, choque e morte (92). A sepse se inicia quando uma alta dose de antígenos bacterianos, como o lipopolissacarídeo (LPS), molécula derivada da membrana externa de bactérias gram negativas como a *Escherichia coli* entra na corrente sanguínea. Esse processo desencadeia o início de sinalização que conduz a resposta inflamatória. O próximo passo é a ativação de monócito/macrófago. Estes ativados produzem e secretam uma variedade de fatores que ativam outros tipos celulares como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1-beta (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6) que direta ou indiretamente causam uma série de alterações, primeiro no sistema imune e vascular e depois nos tecidos (93).

Durante o choque séptico o organismo sofre uma série de agressões severas em diferentes níveis. Danos em múltiplos órgãos, inflamação, coagulação intravascular disseminada e bloqueio metabólico celular generalizado, resultam em falência de múltiplos órgãos e morte (93). O congestionamento capilar, vasodilatação e fenômeno de falência cardíaca reduzem o fluxo sanguíneo aos tecidos. A infiltração e a ativação de neutrófilos e outras células danifica as membranas biológicas, especialmente a microvasculatura do endotélio.

Órgãos como pulmão e fígado são particularmente susceptíveis aos danos produzidos pelo infiltrado celular. O dano pulmonar é resultado de uma síndrome de falência respiratória progressiva, em que fluidos dos tecidos escapam do sangue para o espaço alveolar, devido às lesões do endotélio causadas direta ou indiretamente pela sepse. A perda da função hepática é o resultado da dificuldade em manter os níveis sanguíneos de glicose adequados e nos rins o dano epitelial é devido à redução da perfusão sanguínea (94).

A disfunção cerebral ocorre em caso de sepse, porém sua patofisiologia ainda é pouco conhecida. Inflamação, anormalidades na BHE e apoptose podem estar envolvidas (95). A encefalopatia é uma complicação comum em pacientes com sepse. Além disso, injúria cerebral e doenças neurodegenerativas, incluindo o Alzheimer e esclerose múltipla, podem ser significativamente exarcebadas por uma infecção sistêmica que causa mudanças na atividade neuroendócrina e motora (96).

5.8 Anatomia do SNC

O cérebro é um órgão complexo o qual possui regiões de densidade e tipos celulares diferentes. Grosso modo, neste trabalho, fracionamos o cérebro em três porções: cerebelo, córtex e mesencéfalo.

O cerebelo está localizado na parte posterior do cérebro. É o centro coordenador dos movimentos e intervém também no equilíbrio do corpo e na sua orientação. Apresenta dobras em sua superfície e a substância cinzenta de sua parte cortical penetra no interior da branca, formando arborizações. Entre seus dois hemisférios se interpõe uma pequena saliência que possui como função a coordenação dos movimentos comandados pelo cérebro, garantindo uma perfeita harmonia entre eles. Além disso, é responsável pelo

tônus muscular regulando o grau de contração do músculo em repouso mantendo o equilíbrio do corpo, graças às suas ligações com os canais semicirculares do ouvido interno (97).

A camada externa de substância cinzenta que é constituída principalmente por corpos neuronais e fibras amielínicas é denominada córtex. Em humanos, possui uma espessura de 1-4mm, com uma área de $0,22\text{m}^2$ (se fosse disposto num plano). Nesta parte do cérebro são desempenhados papéis centrais em funções complexas como na memória, atenção, consciência, linguagem, percepção e pensamento. Em animais com capacidade cerebral mais desenvolvida, o córtex forma sulcos para aumentar a área de processamento neuronal, minimizando a necessidade de aumento de volume. O córtex é composto por 6 camadas, e por dois tipos principais de células: estreladas IV (que são células receptoras) e piramidais V (que são células efectoras) (97).

O mesencéfalo, ou mesencéfalo, é uma região curta e estreita entre o encéfalo anterior e o posterior. No interior do mesencéfalo se situa um pequeno canal, o aqueduto do mesencéfalo, que une o terceiro ventrículo do diencéfalo ao quarto ventrículo, do metencéfalo. Apesar da aparente simplicidade de estrutura, as funções do mesencéfalo são marcadamente diversas. Além de servir como um condutor para a passagem de informação da medula para córtex e vice-versa, o mesencéfalo contém neurônios que contribuem para o sistema sensorial, o controle do movimento e várias outras funções (98).

Abaixo apresentamos um esquema simplificado do cérebro de ratos e localização destas três estruturas.

Figura 9 – Regiões do cérebro estudadas.

6 OBJETIVOS

6.1 *Objetivo Geral*

Avaliar a concentração de TRP sérica e no tecido do SNC e sua metabolização à QUIN na vigência de choque endotóxico induzido por LPS.

6.1.1 Objetivos específicos

1. Padronização de um modelo de hipertriptofanemia na vigência de processo endotóxico.
2. Padronização de condições de extração dos metabólitos em amostras biológicas como soro e tecido através de cálculo de rendimento.
3. Determinação de TRP e QUIN por HPLC (fez-se também a busca por outros metabólitos, como 5-HT, MEL e seus derivados, entretanto não houve sensibilidade suficiente para o ensaio).
4. Determinação do parâmetro QUIN/TRP para os ensaios realizados.
5. Análise da interferência da injeção de LPS sobre a concentração de TRP e formação de QUIN no soro e em regiões do SNC.

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Reagentes

Os reagentes acetonitrila (ACN) grau HPLC, acetona PA, álcool etílico PA, fosfato de potássio monobásico, fosfato de sódio bibásico, metanol grau HPLC, foram adquiridos da Merck kGaA (Darmstadt, Alemanha). Melatonina, quinurenina, serotonina, L-triptofano e lipopolissacarídeo (LPS) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (Mo-USA)/ Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinbein, Alemanha).

A água ultra pura é proveniente do equipamento Milli Q Synthesis, previamente purificado pelo equipamento Elix equipamentos Millipore Indústria e Comércio (USA), garantindo uma boa qualidade da água.

7.2 Equipamentos

Para este trabalho utilizamos os seguintes equipamentos: balança Shimadzu BL 3200H, banho maria 37 °C FANEM 100, centrífuga de bancada Eppendorf, modelo 5804R, *High Performace Liquid Chromatography* (HPLC) (SLC-10A VP) com detectores de arranjo de diodos (*diode array*) (SPD-M 10A VP) e fluorescência (RF 10A XL) Shimadzu, coluna de fase reversa LUNA C-18 (25cm x 4,6mm, 5µm) (Phenomenex), *Liquid Chromatography* (LC) acoplado a *Mass Spectrometer* (MS) com analisador do tipo *ion trap* (HPLC SIL-20AC Prominence Shimadzu e espectrômetro de massas Esquire-HCT Bruker com ionização por *electrospray*).

7.3 Protocolo Experimental

7.3.1 Animais

Utilizamos ratos Wistar machos com aproximadamente dois (2) meses de idade. Estes animais formaram 4 grupos de 6 animais cada e destes coletamos sangue e cérebro. Os animais foram anestesiados com xilazina 90 µL/Kg e cetamina 45 µL/Kg no momento da coleta. O sangue foi obtido através da punção da artéria abdominal e o cérebro foi separado em 3 partes: cerebelo, mesencéfalo e córtex. Do sangue total obtivemos o soro e do tecido nervoso foi obtido um homogenato de cada região previamente seccionada.

7.3.2 Grupo experimental

Grupo I – Controle

Injeções subcutânea de solução salina nos tempos 0 e 2 horas com coleta após 1 hora da última injeção.

Grupo II – LPS

Injeções intravenosa de LPS (1 mg/Kg) no tempo 2 horas com coleta após 1 hora da última injeção.

Grupo III – TRP

Injeções subcutânea de TRP (0,8 mg/kg) nos tempos 0 e 2 horas com coleta após 1 hora da última injeção.

Grupo IV – TRP + LPS

Injeções subcutânea de TRP (0,8 mg/kg) + LPS intravenosa (1 mg/Kg) nos tempos 0 e 2 horas com coleta após 1 hora da última injeção.

7.3.3. Avaliação da resposta animal frente ao processo séptico

O animal foi avaliado frente aos principais sintomas visíveis no processo endotóxico como tremor, eriçamento do pelo (febre), inquietação, agitação e convulsão.

7.3.4 Tratamento com acetona

Tratamos 1,0 mL de amostra (soro ou homogenato cerebral) com 2,3 mL de acetona. Essa mistura foi agitada em vórtex por 10 segundos e centrifugada a 4.000 rpm por 1 hora a 4°C.

Após centrifugação, a fase orgânica foi retirada e evaporada em N₂. A amostra foi ressuspensa com 500 µL de acetonitrila/água (25:75), filtrada e injetada no HPLC.

Identificação e quantificação de TRP, NFK e QUIN

As amostras foram analisadas por um sistema de HPLC. Injetamos 40 µL da amostra em coluna de fase reversa Luna C-18 (250x4, 60 mm, 5µm) e analisamos por 25 minutos com um fluxo de fase móvel de 1 mL/min. Após a separação dos componentes da amostra, analisamos as substâncias pelos detectores de arranjo de diodos e de fluorescência. A fase móvel foi composta por acetonitrila:água em um método gradiente realizado por duas bombas. Mantivemos 100% de água durante 0,02 minutos de corrida. Aumentamos linearmente a concentração de acetonitrila (ACN) atingindo 10% em 22 minutos. A partir desse tempo a concentração de ACN diminuiu linearmente até 0% no minuto 25. Os comprimentos de ondas (λ) 280 nm, 325 nm e 365 nm foram monitorados pelo detector de arranjo de diodos e eles correspondem ao TRP, NFK e QUIN, respectivamente. O limite de detecção (S/N = 3:1) foi de 244 nM e o limite de quantificação (S/N = 10:1) foi de 488 nM tanto para TRP quanto para QUIN. Nas condições utilizadas a relação do sinal com a concentração se mostrou linear na faixa analisada (0,00195 – 2 mM).

Figura 10: Cromatograma do tempo de retenção de (A) triptofano e (B) quinurenina.

Figura 11: curva padrão da concentração (mM) de (A) triptofano e (B) quinurenina.

7.3.5 Identificação e isolamento de produtos de oxidação da MEL

Monitoramos a formação de MEL, AFMK e AMK por HPLC. Injetamos alíquotas de 40 μ L em coluna de fase reversa Luna C-18 (250x4, 60 mm, 5 μ m). Eluímos as amostras com fluxo de 1,0 mL/minuto em fase móvel de ACN:H₂O (25:75). Detectamos o AFMK por fluorescência (excitação 340 nm e emissão 460 nm) e AMK por UV-VIS absorvância (254 nm). O limite de detecção (S/N = 3:1) foi 0,15 e 0,10 μ M e o limite de quantificação (S/N = 10:1) foi 0,5 e 0,33 μ M, para AFMK e AMK respectivamente. Nas condições utilizadas a relação do sinal com a concentração se mostrou linear para os dois compostos na faixa

analisada (0, 001-0, 025 mM) (31).

Figura 12: Cromatograma do tempo de retenção de (A) AFMK e AMK e (B) MEL.

7.3.6 Ensaio de atividade de IDO

Analizamos a atividade da enzima IDO monitorando a formação de QUIN, o segundo produto da via das quinureninas. Para isso utilizamos o ensaio de atividade previamente descrito por Yamamoto, S. e Hayaishi, O. (51). Cada reação continha o tampão de fosfato de potássio pH 6,5 (50 mM), o substrato L -TRP (200 μ M), os ativadores da enzima ascorbato (20 mM) e azul de metileno (10 μ M), a catalase (100 μ g/mL) para degradação de H_2O_2 formado por ascorbato/azul de metileno e enzima IDO (2,2 μ g/mL). Iniciamos a reação adicionando a enzima e após 30 minutos a 37°C cessamos a reação com 6% de ácido tricloroacético. Degradamos toda a NFK, primeiro produto da via das quinureninas, a QUIN deixando a reação por 15 minutos a 65°C. Centrifugamos as amostras a 13.000 g a 4°C por 10 minutos e as filtramos em membranas de 0,22 μ m de poro para posterior análise em HPLC. Realizamos ainda um branco de reação sem a presença da enzima para monitorarmos principalmente a contaminação de QUIN.

7.3.7 Western blotting de IDO e TDO

Padronizamos a detecção da proteína IDO e TDO pela técnica de *Western blotting* usando anticorpo poli clonal específico. Utilizamos gel de poliacrilamida de 12%, 40 µg de proteínas totais e corremos o gel a 150 V por aproximadamente 1 hora. Transferimos as proteínas em membrana de nitrocelulose, por 1:50 horas em banho de gelo. Bloqueamos a membrana por 2 horas a temperatura ambiente com leite 1% + soro fetal bovino 2% em TBS + tween 20 a 0,1%. Lavamos a membrana 3 vezes de 10 minutos cada com TBS + tween 20 0,1%. Incubamos o anticorpo primário anti-IDO em uma diluição 1:100 diluído em TBS/tween 20 0,1% com 0,5% de leite e anti-TDO em uma diluição 1:1000 diluído em TBS/tween 20 0,1% com 1% de leite por 18 horas a 4°C. Lavamos a membrana com TBS/tween 20 0,1% 3 vezes de 10 minutos cada. Incubamos a membrana com o anticorpo secundário anticabra marcado com HRP por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. A diluição deste anticorpo foi de 1:1000 em TBS/tween 20 0,1% contendo 1% de leite e 2% de soro fetal bovino. Lavamos a membrana novamente 3 vezes e a revelação foi realizada com Kit de revelação ECL[®].

7.3.8 ELISA

As determinações de TNF- α foram feitas através de placas de ELISA montadas e padronizadas a partir do DuoSet da R&D. As placas usadas foram Polysorp (cod. 46957, Nuc-Immuno Module).

	Solução Estoque	Concentração de Uso
Anticorpo de captura	720 µg/mL	4 µg/mL
Anticorpo de detecção	18 µg/mL	100 ng/mL
Padrão	740 ng/mL	1 ng/mL

Tabela 1: Concentrações de anticorpos utilizados para ELISA.

Preparo da Placa

1. Anticorpo de captura foi diluído em PBS, na concentração final desejada. Foram colocados 100µL de anticorpo diluído por poço e a placa foi deixada em local escuro e a temperatura ambiente durante 20 horas.
2. Após o período de sensibilização, os poços foram aspirados e lavados com tampão de lavagem (0,05% Tween 20 em PBS, pH 7.4) por três vezes.
3. Os poços foram bloqueados com 300 uL de tampão de bloqueio (1% de BSA, 5% de sucrose, 0,05% de NaN₃ em PBS), durante 1 hora.

Procedimento de Dosagem

1. Os padrões foram diluídos em reagente diluente (0,1% de BSA, 0,05% de Tween 20 em tampão Tris-salina, pH 7,4) e quando necessário, as amostras foram diluídas no mesmo tampão.
2. Foram pipetados 100 µL de amostra e padrão por poço e incubados durante 2 horas a temperatura ambiente.
3. Após o término do tempo de incubação os poços foram lavados como descrito anteriormente.
4. Em seguida foram adicionados 100 µL de anticorpo de detecção diluído em tampão

diluyente em cada poço e incubado, novamente, por duas horas a temperatura ambiente.

5. As aspirações e as lavagens do passo 2 da preparação da preparação foram repetidas.
6. Foram adicionados 100 μL de estreptavidina-HRP (diluída 1:200 no reagente diluyente), e a placa foi incubada 20 minutos a temperatura ambiente evitando luz direta.
7. As aspirações e as lavagens do passo 2 da preparação da preparação foram repetidas.
8. Foram adicionados 100 μL d solução substrato em cada poço e a placa foi incubada durante 20 minutos a temperatura ambiente evitando luz direta. A solução substrato foi preparada diluindo o reagente colorido A (H_2O_2) e o reagente colorido B (tetrametilbenzadina) na proporção 1:1.
9. Para terminar a reação foram adicionados 50 μL da solução *stop* (H_2SO_4 2N) em cada poço e homogeneizado.
10. A densidade óptica dos poços foi determinada imediatamente a 450/550 nm.
11. Os resultados foram expressos através da construção de uma curva padrão linear com oito pontos de concentrações conhecidas.

7.4 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizada ANOVA seguido de comparação múltipla de Student Newman Keuls e teste T.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 *TRP e QUIN séricos após a administração de TRP e LPS*

As concentrações séricas de TRP e QUIN de ratos Wistar tratados ou não com TRP e/ou LPS foram determinadas por HPLC. Observamos que a concentração de TRP tanto no grupo controle quanto no grupo ativado com LPS não se alterou. A administração de TRP no regime descrito em materiais e métodos proporciona um aumento da concentração sérica de TRP da ordem de aproximadamente 10 vezes após 1 hora da última administração. Cabe ressaltar que outros regimes de administração de TRP + LPS foram testados e que incluíam variações no número de doses e também no tempo de coleta após a última administração. O aumento no número de doses (de 2 para 3) de TRP + LPS acarretou morte dos animais, enquanto que quando se aumentou o tempo de coleta após a última administração (de 1 hora para 12 ou 24 horas) não foi possível detectar aumento sérico de TRP (dados não mostrados). Estes dados indicam que a administração de TRP + LPS é extremamente tóxica para os animais e que sua depuração no soro é bastante rápida.

Figura 13 – Concentrações séricas de TRP nos grupos controle, LPS (1mg/Kg), TRP (0,8mg/Kg) e TRP +LPS. Os dados representam a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes. GI e GII não foram diferentes entre si, mas foram significativamente diferentes do GIII e GIV (** $p < 0,001$). Na figura são mostradas as diferenças entre os grupos GIII e GIV (** $p < 0,001$).

Em relação à QUIN (**Figura 14**), observamos que a sua concentração basal (GI) é baixa não sendo diferente do grupo ativado com LPS (GII). Entretanto há um aumento significativo (aproximadamente 2 ordens de grandeza) de QUIN no grupo que recebeu alta dose de TRP (GIII $p < 0.001$). Quando LPS também é administrado (GIV) o aumento de QUIN é ainda superior quando comparado com o GIII.

Figura 14 – Concentrações séricas de QUIN nos grupos controle, LPS (1mg/Kg), TRP (0,8mg/Kg) e TRP +LPS. Os dados representam a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes. GI e GII não foram diferentes entre si, mas foram significativamente diferentes do GIII e GIV (** $p < 0,001$). Na figura são mostradas as diferenças entre os grupos GIII e GIV (** $p < 0,01$).

A partir dos dados das figuras 13 e 14 vê-se que a administração de LPS acarreta uma maior disponibilização de TRP no soro cuja origem é desconhecida. Uma possível explicação para esse fenômeno é a de que esta maior disponibilização de TRP represente uma mobilização necessária para atender suplementação de energia necessária durante o processo inflamatório, entretanto o fato de não termos observado aumento de TRP quando o GII é comparado ao GI não suportam esta hipótese. O TRP é principalmente captado pelo fígado; é possível que uma resposta inflamatória aguda interfira com esta captação e que este fenômeno só seja visível quando há um excesso de TRP.

A relação QUIN/TRP é bastante usada para definir estados que acarretam em ativação da enzima IDO. Muitas vezes esta relação acaba sendo importante como marcador diagnóstico em situações patológicas. Por exemplo, a relação QUIN/TRP é usada como marcadora de invasividade tumoral (99).

Na **Figura 15** mostramos as relações QUIN/TRP para os quatro grupos ensaiados. Vê-se um aumento na relação QUIN/TRP para os grupos III e IV que atingem valores da ordem de 7-10 vezes superior aos grupos controle e tratados com LPS.

Figura 15 – Relação QUIN/TRP para os grupos controle, LPS (1mg/Kg), TRP (0,8mg/kg) e TRP + LPS.

O balanço entre TRP e QUIN deve depender das atividades da TDO versus IDO. Como possibilidade propomos as hipóteses representadas na **Figura 16**, na qual a ação combinada de aumento da atividade de IDO e diminuição de TDO definem tanto a concentração de TRP quanto a formação de QUIN no soro e cérebro.

Figura 16 - TRP pode ser metabolizado à QUIN pela enzima TDO ou IDO. O balanço da atividade destas 2 enzimas define o “pool” de TRP e de QUIN encontrado no soro no tecido (cérebro). A sobrecarga de TRP e a administração de LPS por si só podem alterar o padrão destas enzimas levando como resultante a variações na concentração sérica e tecidual de TRP e QUIN.

Também tentamos mensurar MEL, AFMK e AMK nos grupos analisados, entretanto não conseguimos medir nenhum destes compostos possivelmente por falta de sensibilidade do método.

Analizamos a presença de TNF- α no soro dos animais, para certificarmos que o nosso tratamento induzia ativação imune. Como se observa na **figura 17**, nos grupos GII e GIV há um aumento significativo de TNF- α sérico.

Figura 17: Concentração de TNF- α nos grupos controle, LPS (1mg/Kg), TRP (0,8mg/kg) e TRP + LPS.

Uma análise conjunta dos resultados, especialmente a ausência de alterações mensuráveis nas concentrações de TRP e QUIN no grupo que recebeu apenas LPS nos leva a considerar a possibilidade de que a concentração, tempo entre as administrações de LPS ou então o momento do sacrifício dos animais após o ultimo tratamento não foram suficientes para evidenciar modificação na metabolização do TRP. De qualquer modo não teria sido possível utilizar concentrações mais elevadas de LPS, pois em experimento piloto os animais do GIV foram a óbito após uma segunda dose.

8.2 TRP e QUIN em regiões do SNC após administração de TRP e LPS

Determinamos as concentrações de TRP e QUIN em 3 diferentes regiões do cérebro, cerebelo, córtex e mesencéfalo de ratos Wistar tratados ou não com TRP e/ ou LPS. Para o TRP (**Figuras 18 A, C e E**) verificamos que não houve diferença entre o grupo GI e GII, entretanto a administração deste composto elevou significativamente a concentração de TRP nas três regiões avaliadas. O grupo GIV apresentou um aumento de TRP significativo quando comparado aos outros grupos inclusive ao GIII. O perfil de TRP foi

semelhante para as 3 regiões do cérebro.

Para a QUIN (**Figuras 18 B, D e F**) não observamos novamente diferenças entre os grupos GI e GII, entretanto a administração de TRP também acarretou um aumento na concentração deste composto em relação aos grupos sem este tratamento. Isto ocorreu para as três regiões avaliadas. Quando avaliamos o GIV verificamos que para o cerebelo não foi encontrado diferença da concentração de QUIN com relação ao grupo GIII. Já no córtex e mesencéfalo verificamos o aumento significativo da concentração de QUIN em relação aos outros grupos avaliados. Interessantemente, verificamos que no córtex as concentrações de QUIN encontradas nos ratos tratados com TRP na presença ou ausência de LPS foram maiores do que os encontrados nos outros grupos.

TRIPTOFANO

QUINURENINA

Figura 18 – Concentrações teciduais de TRP e QUIN em diferentes porções do SNC nos grupos controle, LPS (1mg/Kg), TRP (0,8mg/kg) e TRP + LPS. Os dados representam a média e desvio padrão de 3 experimentos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

Apesar de não haver diferença no conteúdo de TRP e QUIN no GI, GII e GIII para nenhuma das porções do SNC estudadas, observamos que há diferença quando comparamos o conteúdo de TRP e QUIN para o GIV, neste caso há um aparente aumento de TRP na região do córtex quando comparado ao cerebelo e mesencéfalo (**Figura 19 A**) e diferença estatística para QUIN no córtex para o mesencéfalo e cerebelo (**Figura 19 B**).

Figura 19 – Concentrações teciduais de TRP e QUIN em diferentes porções do SNC no grupo TRP + LPS. Os dados representam a média e desvio padrão de 3 experimentos. * $p < 0,05$.

Avaliamos a relação QUIN/TRP nas três regiões do cérebro (**Figura 20**). Verificamos que em todas as regiões avaliadas os grupos GI e GII foram os que apresentaram menor relação QUIN/TRP. Nos GIII e GIV a relação QUIN/TRP foram significativamente elevadas em relação aos demais e não apresentaram diferenças significativas entre eles.

Figura 20: Relação QUIN/TRP para os grupos controle, LPS (1mg/Kg), TRP (0,8mg/kg) e TRP + LPS nas diferentes regiões estudadas.

Também tentamos mensurar MEL, AFMK e AMK nos grupos analisados, entretanto não conseguimos medir nenhum destes compostos possivelmente por que, como já comentado nos resultados de soro, não deve haver sensibilidade suficiente.

Para verificar se o aumento de QUIN nos grupos GIII e GIV estava associado ao aumento da atividade de IDO, nós realizamos o ensaio de atividade desta enzima. Como já era esperado, não verificamos uma atividade evidente desta enzima no tempo de 3 horas, uma vez que esta enzima é induzível, levando um tempo para que fosse perceptível um aumento expressivo da sua atividade.

Apesar da diferença na produção de QUIN no córtex em relação às outras regiões do SNC, não foi encontrada diferença da atividade de IDO medida no ensaio clássico de

determinação desta enzima. Diante disso, foi avaliada a expressão das enzimas TDO e IDO através de Western Blotting. Como verificado na **figura 21**, o tratamento, aparentemente, não alterou a expressão da TDO nas diferentes regiões do cérebro.

Figura 21: Expressão de TDO nas diferentes regiões do SNC.

A análise de expressão de IDO por western blotting é difícil e demanda um bom tempo de padronização, assim como a TDO, esta também foi avaliada em todas as regiões do cérebro. Entretanto, apenas na região do córtex foi possível detectar a enzima conforme a **figura 22**, na qual não foi possível detectar diferenças significativas da expressão de IDO pelo tratamento utilizado.

Figura 22: Expressão de IDO nas diferentes regiões do SNC.

9 CONCLUSÃO

Como conclusão, sabemos que a rota das quinureninas tem um papel importante na patofisiologia das doenças neuroinflamatórias e no presente estudo, demonstramos que a resposta frente a sobrecarga de TRP e choque endotóxico leva ao acúmulo de QUIN no soro e cérebro.

No nosso estudo notamos que não há modificação do conteúdo de TRP nem de QUIN séricos quando se faz a administração de LPS. Este dado pode indicar que a concentração de LPS ou o tempo de medida após administração de LPS não tenham sido suficientes para causar qualquer alteração no conteúdo de IDO. A dose de LPS baseou-se em dados anteriores da literatura e pode se observar sinais clínicos típicos de choque nesses animais, ou seja, pelos eriçados, aumento de sede, diminuição de atividade. É possível que o tempo entre a administração de LPS e avaliação de TRP e QUIN no soro não tenham sido suficientes para detectarmos modificações. Neste sentido, comparado a um trabalho publicado com meningite pneumocócica, foi observado aumento na expressão de IDO superior a 10 vezes após 22hs de infecção (100).

A sobrecarga de TRP por si só acarreta uma mudança importante no comportamento dos animais; faz-se nítida uma agitação. Os animais voltam a um comportamento “normal” após algumas horas sendo que após 24 horas não há excesso de TRP presente. O grupo tratado com TRP + LPS conserva parte do comportamento do grupo que recebeu apenas LPS; ou seja, foram observados os pelos eriçados e aumento de sede.

Um dos dados mais significativos em relação a mortalidade é a de que apesar de uma dose extra de TRP ser tolerada pelos animais que não receberam LPS (GIII); há uma mortalidade quase que instantânea e total dos animais que receberam LPS (GIV). Desta forma fica evidente que componentes inflamatórios sinergizam a toxicidade de TRP. Este

dado não foi previamente relatado na literatura e pode significar o envolvimento de alguns mecanismos do choque endotóxico.

Como a concentração de TRP no soro é maior no GIV do que no GIII, sugerimos que a toxicidade do GIV não seja advinda da maior passagem de TRP para o SNC. O aumento de TRP no GIV pode significar uma redução na utilização hepática de TRP e talvez também de sua metabolização via TDO. A transferência de metabolização da TDO para IDO poderia em parte explicar o aumento sérico tanto de TRP quanto de QUIN no GIV.

A sobrecarga de TRP acarreta um aumento na concentração de TRP nas 3 regiões do SNC e para estas mesmas regiões a ação combinada de sobrecarga de TRP com a injeção de LPS aumenta ainda mais a concentração de TRP. Este fato é curioso e poderia ser explicado pelas seguintes hipóteses: o processo inflamatório poderia acarretar o aumento da permeabilidade da BHE ou então modificar o sistema de transporte ativo de TRP através da membrana. Há ainda a possibilidade de que no choque endotóxico, pela síntese de diversos compostos, ou então pela ação do próprio LPS, haja a interferência no processo de dissociação do TRP com a albumina. É muito possível que todos esses processos estejam de alguma forma envolvidos. Sabe-se, por exemplo, que o estresse e processo inflamatório agem sobre o sistema simpático e que este, por sua vez, atua no transportador de aminoácidos via BHE.

O aumento da atividade de IDO e elevação da concentração de QUIN é vista em várias condições dentre as quais, por exemplo, a isquemia. Neste caso foi observada uma resposta dependente da localização, ou seja, hipocampo > estriato > córtex > tálamo (101). Este aumento seria decorrente da severidade da injúria local e inflamação. No nosso caso é nítida uma maior produção de QUIN no córtex, indicando que esta região deve ter uma maior atividade de IDO. Como no nosso desenho experimental, entre o tempo zero e

sacrifício dos animais, há apenas 3 horas, imaginamos que este tempo não seja suficiente para o aumento da expressão de IDO.

10 REFERÊNCIAS

1. Takikawa, O. Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338:12–19. 2005.
2. Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., & Eynde, B.J.V.D. Evidence for tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3 dioxygenase. *Nat. Med.* 9 (10): 1269-1274. 2003.
3. Cowen, P.J. Serotonin and depression: pathophysiological mechanism or marketing myth? *Trends. Pharmacol. Sci.* 29(9):433-6. 2008.
4. Munn, D.H., Sharma, M.D, Baban, B, Harding, H.P., Zhang, Y., Ron, D., Mellor, A.L. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity.* 22(5):633–642. 2005.
5. MacKenzie, C.R., Heseler, K., Müller, A., Däubener, W. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines. *Curr Drug Metab.* 8(3):237-44. 2007.
6. Coppen, A., Eccleston, E.G., Peet, M. Total end free tryptophan concentration in the plasma of depressive patients. *Lancet.* 2:60-63. 1973.
7. Cowen, P.J., Parry-Billings, M., Newsholme, E.A. Decreased plasma tryptophan levels in major depression. *J. Affect. Disord.* 16: 27-31. 1989.
8. Lam, R.W., Zis, A.P., Grewal, A., Delgado, P.L., Charney, D.S., Krystal, J.H. Effects of rapid tryptophan depletion in patients with seasonal affective disorder in remission after light therapy. *Arch. Gen. Psychiatry.* 53:41-44. 1996.
9. Peters, J.C. Tryptophan nutrition and metabolism: an overview. *Adv. Exp. Med. Biol.* 294, 345–358. 1991.
10. Hayaishi, O., Rothberg, S., Mehler, A.H., Saito, Y. Studies on oxygenases: enzymatic formation of kynurenine from tryptophan. *J. Biol. Chem.* 229:889–896. 1957.
11. Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Bianchi, R., Orabona, C., Spreca, A., Fioretti, M.C., Puccetti, P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.* 9(10):1069–1077. 2002.
12. Terness, P., Bauer, T.M., Rose, L., Dufter, C., Watzlik, A., Simon, H., Opelz, G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-

- expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med.* 196(4):447–457. 2002.
13. Belladonna, M.L., Grohmann, U., Guidetti, P., Volpi, C., Bianchi, R., Fioretti, M.C., Schwarcz, R., Fallarino, F., Puccetti, P. Kynurenine pathway enzymes in dendritic cells initiate tolerogenesis in the absence of functional IDO. *J Immunol.* 177(1):130–7. 2006.
14. Stone, T.W., Perkins, M.N. Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. *Eur. J. Pharmacol.* 72: 411–412. 1981.
15. 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.
16. Bordelon, Y. M., Chesselet, M.-F., Nelson, D., Welsh, F., Erecinska, M. Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum. *J. Neurochem.* 69: 1629–1693. 1997.
17. Baran, H., Staniek, K., Kepplinger, B., Gille, L., Stolze, K., Nohl, H. Kynurenic acid influences the respiratory parameters of rat heart mitochondria. *Pharmacology* 62: 119–123. 2001.
18. Santamaria, A., Jiménez-Capdeville, M.E., Camacho, A., Rodrigues-Martinez, E., Flores, A., Galván-Arzate, S. In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *Neuroreport.* 12, 2693–2696. 2001
19. Behan, W.M.H., McDonald, M., Darlington, L.G., Stone, T.W. Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl. *Br. J. Pharmacol.* 128:1754–1760. 1999.
20. Kim, J.P., Choi, D.W. Quinolinic acid neurotoxicity in cortical cell culture. *Neuroscience.* 23:423–432. 1987.
21. Khaspekov, L., Kida, E., Victorov, I. & Mossakowski, M. J. Neurotoxic effect induced by quinolinic acid in dissociated cell culture of mouse hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 22:150–157. 1989.
22. Perkins, M.N., Stone, T.W. An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Res.* 247:184–187. 1982.
23. Henderson, G., Johnson, J.W., Ascher, P. Competitive antagonists and partial agonists at the glycine modulatory site of the mouse NMDA receptors. *J. Physiol.* 430:189–212. 1990.

24. Birch, P.J., Grossman, C.J., Hayes, A. G. Kynurenic acid antagonises responses to NMDA via an action at the strychnine-insensitive glycine receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 154: 85–87. 1988.
25. Schwarcz, R., Ceresoli-Borrone, G., Wu, H.Q., Rassoulpour, A., Poeggeler, B., Hodgkins, P.S., Guidetti, P. Modulation and function of kynurenic acid in the immature rat brain. *Adv. Exp. Med. Biol.* 467:113–123. 1999.
26. Erhardt, S., Oberg, H. & Engberg, G. Pharmacologically elevated levels of endogenous kynurenic acid prevent nicotine-induced activation of nigral dopamine neurons. *Arch. Pharmacol.* 363: 21–27. 2001.
27. Eastman, C.L., Guilarte, T.R. The role of hydrogen peroxide in the in vitro cytotoxicity of 3-hydroxykynurenine. *Neurochem. Res.* 15: 1101–1107. 1990.
28. Okuda, S., Nishiyama, N., Saito, H., Katsuki, H. 3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. *J. Neurochem.* 70: 299–307. 1998.
29. Hdanova, I.V, Lynch, H.J, Wurtman, R.J, Melatonin: a sleep-promoting hormone. *Sleep.* 20(10):899-907. 1997.
30. Hirata, F., Hayaishi, O., Tokuyama, T., Seno, S. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J Biol Chem*, 249(4):1311-3. 1974.
31. Silva, S.O., Ximenes, V.F., Catalani, L.H., Campa, A. Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of melatonin by activated neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*, 279(2):657-62. 2000.
32. Silva, S.O., Rodrigues, M.R., Carvalho, S.R.Q., Catalani, L.H., Campa, A., Ximenes, V.F. Oxidation of melatonin and its catabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine and N1-acetyl-5-methoxykynuramine, by activated leukocytes. *J. Pineal. Res.* 37:171–175. 2004.
33. Rodrigues, M. R.; Rodriguez, D.; Catalani, L. H. Interferon-gamma independent oxidation of melatonin by macrophage. *J. Pineal Res.* 34: 69–74. 2003.
34. Tan, D.X., Manchester, L.C., Burkhardt, S., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Kohen, R., Shohami, E., Huo, Y.S., Hardeland, R., Reiter, R.J. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J.* 15(12): 2294-2296. 2001.
35. Than, N.N., Heer, C., Laatsch, H., Hardeland, R. Reactions of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK) with the ABTS cation radical: identification of new oxidation products. *Redox Report.* 11(1):15-24. 2006.

36. Pugazhenth, K., Kapoor, M., Clarkson, A.N., Hall, I., Appleton, I. Melatonin accelerates the process of wound repair in full-thickness incisional wounds. *J. Pineal Res.* 44:387–396. 2008.
37. Pedrosa, A.M.C. Triptofano, melatonina e seus produtos de oxidação: ações sobre os linfócitos T. São Paulo, 2006. 157p. tese de doutorado– Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
38. Sneden, W., Mellor, C.S., Martin, J.R., Familial hypertryptophanemia, tryptophanuria and indoleketonuria. *Clin. Chim. Acta* 131(3), 247-256. 1983.
39. Levy, H.L., Hartnup disorder. In. *The metabolic and Molecular bases of inherited diseases*, 8th, 1667-1724, 2001
40. Fenton, D.A., Wilkinson, J.D., Family exhibiting cerebellar-like ataxia, photosensitivity and shortness of stature a new inborn error of tryptophan metabolism. *J R Soc Med* 76:736–739
41. Allegri, G., Ragazzi, E., Bertazzo, A., Costa, C.V., Rocchi, R. Tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in rats. *Adv. Exp. Med. Biol.* 527, 481–496; 2003.
42. Kotake, Y. and Masayama, I. The Intermediary metabolism of tryptophan. XVIII. The mechanism of formation of kynurenine from tryptophan. *Z. Physiol. Chem.* 243, 237–244. 1936.
43. Forouhar, F., Anderson, J.L, Mowat, C.G, Vorobiev, S.M, Hussain, A, Abashidze, M, Bruckmann, C, Thackray, S.J, Seetharaman, J, Tucker, T, Xiao, R, Ma, L.C, Zhao, L, Acton, T.B, Montelione, G.T, Chapman, S.K, Tong, L. Molecular insights into substrate recognition and catalysis by tryptophan 2,3 dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci.* 104(2):473-478. 2007
44. Botting, N.P. Chemistry and neurochemistry of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism. *Chem Soc Rev* 24, 401-412. 1995
45. Thackray, S.J., Bruckmann, C., Anderson, J.L., Campbell, L.P., Xiao, R., Zhao, L., Mowat, C.G., Forouhar, F., Tong, L., Chapman, S.K. Histidine 55 of tryptophan 2,3-dioxygenase is not an active site base but regulates catalysis by controlling substrate binding. *Biochemistry* 47, 10677–10684. 2008
46. Basran, J., Rafice, S.A., Chauhan, N., Efimov, I., Cheesman, M.R., Ghamsari, L. and Raven, E.L. A kinetic, spectroscopic, and redox study of human tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochemistry* 47, 4752–4760. 2008

47. Gal, E.M. and Sherman, A.D. L-kynurenine: its synthesis and possible regulatory function in brain. *Neurochem Res* 5, 223-239).1980
48. Yamamoto, S. and Hayaishi, O. Tryptophan pyrrolase of rabbit intestine: d-and l-tryptophan-cleaving enzyme or enzymes. *J. Biol. Chem.* 242, 5260–5266 1967
49. Watanabe, Y., Fujiwara, M., Yoshida, R. and Hayaishi, O. Stereospecificity of hepatic l-tryptophan 2,3-dioxygenase. *J. Biochem.* 189, 393–405. 1980
50. Searles, L.L., Ruth, R.S., Pret, A.M., Fridell, R.A. and Ali, A.J. Structure and transcription of the *Drosophila melanogaster* vermilion gene and several mutant alleles. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1423–1431. 1990
51. Zhang, Y., Kang, S.A., Mukherjee, T., Bale, S., Crane, B.R., Begley, T.P. and Ealick, S.E. Crystal structure and mechanism of tryptophan 2,3-dioxygenase, a heme enzyme involved in tryptophan catabolism and in quinolinate biosynthesis. *Biochemistry* 46, 145–155. 2007
52. Iwamoto, Y., Lee, I.S., Tsubaki, M. and Kido, R. Tryptophan 2,3-dioxygenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.* 41, 19–26. 1995.
53. Miller, C.L., Llenos, I.C., Dulay, J.R., Barillo, M.M., Yolken, R.H., Weis, S., Expression of the kynurenine pathway enzyme tryptophan 2,3-dioxygenase is increased in the frontal cortex of individuals with schizophrenia. *Neurobiol Dis* 15, 618-629. 2004.
54. Masaaki Kanai, Toshikazu Nakamura, Hiroshi Funakoshi, Identification and characterization of novel variants of the tryptophan 2,3-dioxygenase gene: Differential regulation in the mouse nervous system during development, *Neuroscience Research* 64: 111–117. 2009
55. Kanai, M. Tryptophan 2,3 dioxygenase is a key modulator of physiological neurogenesis and anxiety-related behavior in mice.
56. Barry, S., Clarke, G., Scully, P., Dinan, T.G, Kynurenine pathway in psychosis: evidence of increased tryptophan degradation, *Journal of Psychopharmacology* 1–8. 2008
57. Schimke, R.T., Sweeney, E.W. and Berlin, C.M. The roles of synthesis and degradation in the control of rat liver tryptophan pyrrolase. *J Biol Chem* 240, 322-331;1965
58. Greengard, O., Smith, M.A. and Acs, G. Relation of cortisone and synthesis of ribonucleic acid to induced and developmental enzyme formation. *J Biol Chem* 238, 1548-1551. 1963

59. Schutz, G., Chow, E. , Feigelson, P. Regulatory properties of hepatic tryptophan oxygenase. *J Biol Chem* 247, 5333-5337. 1972
60. Mangoni, A. 1974 The "kynurenine shunt" and depression. *Adv Biochem Psychopharmacol* 11, 293-298;
61. Badawy, A.A. and Morgan, C.J., Effects of acute paroxetine administration on tryptophan metabolism and disposition in the rat. *Br J Pharmacol* 102, 429-433. 1991
62. Bano, S., Sherkheli, M.A., Inhibition of tryptophan - pyrrolase activity and elevation of brain tryptophan concentration by fluoxetine in rats. *J Coll Physicians Surg Pak* 13, 5-10;2003
63. Badawy, A.-B., Mechanism of enhancement of rat brain serotonin synthesis by acute fluoxetine administration. *J Neurochem* 66,436-437,1996
64. Badawy, A.A., Evans, M. Inhibition of rat liver tryptophan pyrrolase activity and elevation of brain tryptophan concentration by acute administration of small doses of antidepressants. *Br J Pharmacol* 77, 59-67,1982.
65. Higuchi, K. Hayaishi, O. Enzymic formation of D-kynurenin from D-tryptophan. *Arch. Biochem. Biophys.* 120: 397-403. 1967.
66. Sugimoto, H., Oda, S., Otsuki, T., Hino, T., Yoshida, T., Shiro, y. Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: Catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Biophysics.* 103(8): 2611–2616. 2006.
67. Littlejohn, T.K., Takikawa, O., Truscott, R.J., Walker, M.J. Asp274 and his346 are essential for heme binding and catalytic function of human indoleamine 2, 3-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 278: 29525–29531. 2003.
68. Sono, M. The roles of superoxide anion and methylene blue in the reductive activation of indoleamine 2,3 dioxygenase by ascorbic acid or by xanthine oxidase-hypoxanthine. *JBC.* 264(3): 1616-1622. 1989.
69. Ohnishi, T., Hirata, F., Hayaishi, O. Indoleamine 2,3 dioxygenase. Potassium superoxide as substrate. *J. Biol. Chem.* 252: 4643-4647. 1977.
70. Sono, M., Taniguchi, T., Watanabe, Y., Hayaishi, O. Indoleamine 2, 3 dioxygenase. Equilibrium studies of the tryptophan binding to the ferric, ferrous and CO-bound enzymes. *J. Biol. Chem.* 255: 1339-1345. 1980.
71. Hirata, F., Hayaishi. O. Studies on Indoleamine 2, 3-dioxygenase I. superoxide anion as substrate. *JBC.* 250(15): 5960-5966. 1975.

72. Maghzal, G.J., Thomas, S.R., Hunt, N.H. and Stocker, R. Cytochrome b5, not superoxide anion radical, is a major reductant of indoleamine 2,3 dioxygenase in human cells. *JBC*. 283(18):12014-12025. 2008.
73. Shimizu, T., Nomiyama S., Hirata, F., Hayaishi, O. Indoleamine 2, 3 dioxygenase: purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 253(13): 4700-4706. 1978.
74. Ferry, G., Ubeaud, C., Lambert, P.H., Bertin, S., Coge, F., Chomarat, P., Delagrangé, P., Serkiz, B., Bouchet, J.P., Truscott, R.J., Boutin, J.A. Molecular evidence that melatonin is enzymatically oxidized in a different manner than tryptophan: Investigations with both indoleamine 2, 3-dioxygenase and myeloperoxidase. *Biochem. J.* 388: 205–215. 2005.
75. Terentis, A.C., Thomas, S.R., Takikawa, O., Littlejohn, T.K., Truscott, R.J., Armstrong, R.S., Yeh, S.R., Stocker, R. The heme environment of recombinant human indoleamine 2, 3 dioxygenase. Structural properties and substrate-ligand interactions. *J. Biol. Chem.* 277(18): 15788-15794. 2002.
76. Takikawa, O., Yoshida, R., Hayaishi, O. Monooxygenase activities of dioxygenases. Benzphetamine demethylation and aniline hydroxylation reactions catalyzed by indoleamine 2, 3-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 258: 6808–6815. 1983.
77. Poljak, A., Grant, R., Austin, C.J., Jamie, J.F., Willows, R.D., Takikawa, O., Littlejohn, T.K., Truscott, R.J., Walker, M.J., Sachdev, P., Smythe, G.A. Inhibition of indoleamine 2, 3 dioxygenase activity by H₂O₂. *Arch. Biochem. Biophys.* 450: 9-19. 2006.
78. Sedlmayr, P., Blaschitz, A., Wintersteiger, R., Semlitsch, M., Hammer, A., MacKenzie, C.R., Walcher, W., Reich, O., Takikawa, O., Dohr, G. Localization of indoleamine 2,3-dioxygenase in human female reproductive organs and the placenta. *Mol. Hum. Reprod.* 8(4):385-91. 2002.
79. Hayashi, T., Beck, L., Rossetto, C., Gong, X., Takikawa, O., Takabayashi, K., Broide, D.H., Carson, D.A., Raz, E. Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* 114(2):270-9. 2004.
80. Ferdinande, L., Demetter, P., Perez-Novo, C., Waeytens, A., Taideman, J., Rottiers, I., Rottiers, P., De Vos, M., Cuvelier, C.A.. Inflamed intestinal mucosa features a specific epithelial expression pattern of indoleamine 2, 3-dioxygenase. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 21 (2):289-95. 2008.

- 81.Hou, W., Li, S., Wu, Y., Du, X., Yuan, F. Inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase-mediated tryptophan catabolism accelerates crescentic glomerulonephritis. *Clin. Exp. Immun.* 156(2): 363–372. 2009.
- 82.Heyes, M.P., Saito, K., Lackner, a. Wiley, C.A., Achim, C.L., Markey, S.P. Sources of the neurotoxin quinolinic acid in the brain of HIV-1-infected patients and retrovirus-infected macaques. *FASEB J.* 12(10): 881-896. 1998.
- 83.Sanni, L.A., Thomas, S.R., Tattam, B.N., Moore, D.E., Chaudhri, G., Stocker, R., Hunt, N.H. Dramatic changes in oxidative tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in experimental cerebral and non cerebral malaria. *Am. J. Pathol.* 152(2): 611-619. 1998.
- 84.Madras, B.K. Relevance of free tryptophan in serum to tissue tryptophan concentrations. *Metabolism* 23, 1107-1116. 1974.
- 85.Tecott, L., Shtrom, S., Julius, D. Expression of serotonin-gated ion channel in embryonic neural and non neural tissues. *Nik. Cell. Neurosci.* 6: 43-55. 1995.
- 86.Oldendorf WH, Szabo J. Amino acid assignment to one of three blood-brain barrier amino acid carriers. *Am J Physiol.* 230(1):94-8. 1976
- 87.Ruddick, J.P, Evans, A.K, Nutt, D.J, Lightman, S.L, Rook, G.A, Lowry, C.A. Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. *Expert Rev Mol Med.* 8(20):1-27.2006.
- 88.Dunn, A.J, Welch,J Stress and endotoxin induced increases in brain tryptophan and serotonin metabolism depend on sympathetic nervous system activity. *J. Neurochem,* 57:1615-1622.1991.
- 89.Eriksson, T, Carlsson, A. Beta-adrenergic control of brain uptake of large neutral amino acids. *Life Sci,* 42:1583-1589. 1988.
- 90.Gross, B, Ronen,N,Honigman, S, Livne, E. Tryptophan toxicity – time and dose response in rats. *Adv Exp Med Biol.* 467:507-16. 1999.
- 91.Stone, T.W, Endogenous neurotoxins from tryptophan. *Toxicon.* 39:61-73. 2001.
- 92.Brunn, G.J., Platt, J.L., The etiology of sepsis: turned inside out. *Trends in Molecular Medicine.* 12(1): 10-16.2006
- 93.Lo´pez-Bojo´rquez, L.N., DehesaA.D., Reyes-Tera´n,G., Molecular Mechanisms Involved in the Pathogenesis of Septic Shock, *Archives of Medical Research* 35 465–479,2004.
- 94.Oertili, B., Beck-Schimmer,B., Wüthrich, R.P., Mechanisms of Hyaluronan-Induced Up-Regulation of ICAM-1 and VCAM-1 Expression by Murine Kidney Tubular Epithelial Cells: Hyaluronan Triggers Cell Adhesion Molecule Expression Through a

- Mechanism Involving Activation of Nuclear Factor- κ B and Activating Protein-1, *The Journal of Immunology* 161: 3431-3437, 1998
95. Taccone, F.S, Pierrakos, C., HE,X., James, S., Dewitte, O., Vincent, J.L, Backer, D., Cerebral microcirculation is impaired during sepsis: an experimental study., *Crit Care* 14(4),2010
 96. Zhou,H., Andonegui, G., Wong, C.H.Y., Kubes, P., Role of Endothelial TLR4 for Neutrophil Recruitment into Central Nervous System Microvessels in Systemic Inflammation, *The Journal of Immunology* 183, 5244-5250,2009
 97. Pawlak, D, Pawlak, K, Malyszko, J, Mysliwiec, M, Buczko, W, Accumulation of toxic products degradation of kynurenine in hemodialyzed patients. *Int Urol Nephrol.* 33:399-404. 2001.
 98. Spence, A. P., *Anatomia Humana Básica* 2^a edição, Editora Manole. 1991.
 99. Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A., *Neuroscience exploring the brain.* 2^a edição, Lippincott Williams & Wilkins Weinlich, G., Murr, C., Richardsen, L., Winkler, C., Fuchs, D., Decreased serum tryptophan concentration predicts poor prognosis in malignant melanoma patients. *Dermatology.* 214: 8-14. 2007.
 100. Bellac, C.L., Coimbra, R.S., Christen, S, Leib, S.L., Pneumococcal meningitis causes accumulation of neurotoxic kynurenine metabolites in brain regions prone to injury. *Neurobiol Dis.* 24(2):395-402.2006.
 101. Saito, K., Nowak, T.S., Markey, S.P., Heyes, M.P., Mechanism of delayed increases in kynurenine pathway metabolism in damaged brain regions following transient cerebral ischemia. *J. Neurochem.* 60 (1):180-92. 1993.