



UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
DIAGNÓSTICO GENÉTICO E MOLECULAR**

**EFEITOS IN VITRO E EX VIVO DA D-SERINA SOBRE
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉREBRO
DE RATOS JOVENS**

LUCILA DE BORTOLI DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. MOACIR WAJNER

Dissertação para obtenção do título de Mestre
apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Diagnóstico Genético Molecular da
Universidade Luterana do Brasil.

**Canoas
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Moacir, por todos os ensinamentos, conselhos, orientações, paciência e incentivo. Obrigada!

Ao Guilhian, “o chefe do estresse oxidativo”, pessoa incrível, indispensável para realização desse trabalho, obrigada por estar sempre presente e pronto para ajudar.

Aos queridos colegas Bianca, Alexandre Amaral e Carol Fernandes, fundamentais para a realização deste trabalho. Obrigada pela dedicação, pela competência e acima de tudo pelo coleguismo!

À Carol Viegas, César, Anelise, Gustavo e Patrícia, obrigado por serem sempre tão prestativos comigo, pelas dicas, conversas e excelente convívio.

À Ana Paula, obrigado pelo coleguismo, pelos conselhos, pela ajuda com os trabalhos, carinho e amizade.

À Ângela, pelo companheirismo e por estar sempre disposta a ajudar.

À Doda, querida amiga que me acolheu ao chegar e me ensinou muito.

A todos que torceram por mim e desejaram o meu sucesso.

Aos meus tios Valmor e Eloísa, que me acolheram como filha nessa minha caminhada e que foram indispensáveis para que eu pudesse atingir meu objetivo.

Aos meus tios avós Hilton e Salete, que da mesma forma me acolheram e deram todo o suporte de que precisei.

Ao meu querido namorado, quase noivo. Obrigada pela paciência, carinho e compreensão.

Aos meus pais, que sempre me incentivaram a estudar e que abriram mão de muita coisa em razão disto. Obrigado pelo exemplo de amor, caráter... Por confiarem em mim, acreditarem em mim, e acima de tudo por fazerem dos meus sonhos, os seus.

Ao meu querido irmão, que mesmo longe sempre me deu apoio.

A Deus, por permitir que meu sonho se tornasse realidade, por estar sempre ao meu lado e ao lado da minha família nos dando forças para seguir em frente.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 D-aminoácidos.....	16
1.2 D-serina.....	16
1.2.1 Origem e Degradação da D-serina.....	16
1.2.2 Distribuição e Metabolismo da D-serina no Cérebro de Mamíferos.....	18
1.2.3 Funções da D-serina no Cérebro.....	20
1.2.3.1 D-serina como Co-agonista de Receptores NMDA.....	20
1.2.3.2 D-Serina na Interação Glia / Neurônio.....	21
1.2.3.3 D-serina na Formação dos Circuitos Neurais.....	21
1.2.4 D-serina em Doenças.....	22
1.3 Radicais Livres.....	24
1.3.1 Definição.....	24
1.3.2 Lipoperoxidação.....	26
1.3.3 Defesas Antioxidantes.....	27
1.3.3.1 Defesas Antioxidantes Enzimáticas.....	28
1.3.3.2 Defesas Antioxidantes Não-Enzimáticas.....	29
1.4 Estresse Oxidativo.....	30
1.5 Estresse Oxidativo e Doenças Neurodegenerativas	31
2. OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivo Geral.....	34
2.2 Objetivos Específicos.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 Reagentes.....	36
3.2 Animais.....	36
3.3 Estudos <i>in vitro</i>.....	36

3.3.1	Preparação de Homogeneizado de Córtex Cerebral.....	36
3.3.2	Parâmetros de Estresse Oxidativo.....	37
3.3.2.1	Avaliação da Peroxidação Lipídica.....	37
3.3.2.1.1	Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS).....	37
3.3.2.1.2	Quimiluminescência.....	37
3.3.2.2	Medida da Oxidação de Proteínas.....	38
3.3.2.2.1	Medida de Grupamentos Sulfidrila.....	38
3.3.2.2.2	Formação de Carbonilas.....	38
3.3.2.3	Avaliação das Defesas Antioxidantes Não-Enzimáticas.....	38
3.3.2.3.1	Medida das Concentrações de Glutathiona Reduzida (GSH).....	38
3.4	Estudos <i>ex vivo</i>.....	39
3.4.1	Procedimento Cirúrgico.....	39
3.4.1.1	Anestesia.....	39
3.4.1.2	Coordenadas do Estriado.....	40
3.4.1.3	Craniotomia e Injeção de D-serina.....	40
3.4.1.4	Sacrifício dos Animais e Isolamento das Estruturas Estudadas.....	41
3.4.1.5	Preparação de Homogeneizados de Estriado Cerebral.....	41
3.4.2	Parâmetros de Estresse Oxidativo.....	41
3.4.2.1	Avaliação da Peroxidação Lipídica.....	41
3.4.2.2	Avaliação das Defesas Antioxidantes Não-Enzimáticas.....	42
3.4.2.2.1	Medida das Concentrações de Glutathiona Reduzida (GSH).....	42
3.4.2.2.2	Estado Antioxidante Total do Tecido (TAS).....	42
3.4.2.3	Medida das Atividades Antioxidantes Enzimáticas.....	42
3.4.2.3.1	Glutathiona Peroxidase (GPx).....	42
3.4.2.3.2	Catalase (CAT).....	43

3.4.2.3.3 Superóxido Dismutase (SOD).....	43
3.5 Medida de Proteínas.....	43
3.6 Análise Estatística.....	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1 Estudos <i>in vitro</i>	45
4.1.1 Efeito <i>in vitro</i> da D-serina sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	45
4.1.2 Efeito de antioxidantes sobre a peroxidação lipídica induzida por D-serina (TBA-RS) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens <i>in vitro</i>	46
4.1.3. Efeito <i>in vitro</i> da D-serina sobre a quimiluminescência induzida por íon ferroso (Fe ²⁺) e ácido ascórbico (ASC) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	47
4.1.4 Efeito <i>in vitro</i> da D-serina sobre o conteúdo de grupamentos sulfidrila em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	49
4.1.5 Efeito <i>in vitro</i> da D-serina sobre a formação de carbonilas em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	50
4.1.6 Efeito <i>in vitro</i> da D-serina sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	51
4.1.7 Efeito de antioxidantes sobre a redução dos níveis de glutathiona (GSH) induzida por D-serina em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens <i>in vitro</i>	52
4.1.8 Efeito <i>in vitro</i> da D-serina sobre a oxidação de uma solução comercial de glutathiona reduzida (GSH).....	53
4.2 Estudos <i>ex vivo</i>	54

4.2.1. Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em estriado de ratos jovens 30 minutos após a injeção.....	54
4.2.2 - Efeitos da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre o conteúdo de grupos sulfidrila em estriado de ratos jovens 30 minutos após a injeção.....	55
4.2.3 - Efeitos da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre as concentrações de glutatona reduzida (GSH) em homogeneizado de estriado de ratos jovens 30 minutos após a injeção.....	56
4.2.4 - Efeitos da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre o estado antioxidante total do tecido (TAS) em homogeneizado de estriado de ratos jovens 30 minutos após a injeção.....	57
4.2.5 - Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a atividade da glutatona peroxidase (GPx) em estriado de cérebro de ratos jovens 30 minutos após a injeção.....	58
4.2.6 - Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a atividade da catalase (CAT) em estriado de cérebro de ratos jovens 30 minutos após a injeção.....	59
4.2.7 - Efeitos da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) em estriado de cérebro de ratos jovens 30 minutos após a injeção.....	60
4.2.8 - Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em estriado de ratos jovens 2 horas após a injeção.....	61
4.2.9 - Efeitos da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre o conteúdo de grupos sulfidrila em estriado de ratos jovens 2 horas após a injeção.....	62
4.2.10 - Efeitos da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre as concentrações de glutatona reduzida (GSH) em homogeneizado de	

estriado de ratos jovens 2 horas após a injeção.....	62
4.2.11 - Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a atividade da glutathiona peroxidase (GPx) em estriado de cérebro de ratos jovens 2 horas após a injeção.....	63
4.2.12 - Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a atividade da catalase (CAT) em estriado de cérebro de ratos jovens 2 horas após a injeção.....	64
4.2.13 - Efeitos da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) em estriado de cérebro de ratos jovens 2 horas após a injeção.....	65
5. DISCUSSÃO.....	67
6. CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

ALS	esclerose lateral amiotrófica
AMPA	ácido (S)- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
ANOVA	análise de variância
ASC	ácido ascórbico
Ca ²⁺	cálcio
CAT	catalase
CRE	creatina
D-aa	D-aminoácido
DAAO	D-aminoácido oxidase
D-Ser	D-serina
dsr-1	D-serine-responsive transcript-1
dsr-2	D-serine-responsive transcript-2
DTNB	ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico)
EDTA	ácido etileno-diamino-tetra-acético
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
Fe ²⁺	íon ferroso
GABA	ácido gama-aminobutírico
GR	glutaciona redutase
GSH	glutaciona reduzida
GSSG	glutaciona oxidada
GPx	glutaciona peroxidase
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
CAR	L-carnitina
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LOOH	hidroperóxido lipídico
L-Ser	L-serina
LTP	potencialização a longo prazo
NAC	N-acetilcisteína
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo

NMDA	N-metil-D-aspartato
NO [•]	óxido nítrico
MEL	melatonina
Mg ²⁺	magnésio
[•] O ₂	oxigênio <i>singlet</i>
O ₂ ^{•-}	radical superóxido
OH [•]	hidroxila
ONOO ⁻	peroxinitrito
PLP	piridoxal 5'-fosfato
ROO [•]	radical peroxila
SNARE	soluble N-ethyl-maleimide-sensitive factor attachment protein receptor
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
SR	serina racemase
SPSS	pacote estatístico para ciências sociais
TAS	estado antioxidante total do tecido
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBA-RS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
TRO	trolox

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Modelo molecular da serina racemase em seres humanos.....	17
Figura 1.2	Reações de iniciação, propagação e terminação da lipoperoxidação.....	27
Figura 1.3	Dismutação do radical superóxido pela SOD.....	28
Figura 1.4	Decomposição do peróxido de hidrogênio pela CAT.....	29
Figura 1.5	Decomposição de peróxido de hidrogênio, ou outros lipoperóxidos, pela GPx.....	29
Figura 1.6	Redução da GSSG pela GR.....	29
Figura 4.1	Efeito <i>in vitro</i> da D-serina sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	46
Figura 4.2	Efeito de antioxidantes sobre a peroxidação lipídica (TBA-RS) induzida por D-serina em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens <i>in vitro</i>	47
Figura 4.3	Efeito <i>in vitro</i> da D-serina sobre a quimiluminescência induzida por íon ferroso (Fe^{2+}) e ácido ascórbico (ASC) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	48
Figura 4.4	Efeito <i>in vitro</i> da D-serina sobre o conteúdo de grupamentos sulfidríla em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	49
Figura 4.5	Efeito <i>in vitro</i> da D-serina sobre a formação de carbonilas em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	50
Figura 4.6	Efeito <i>in vitro</i> da D-serina sobre as concentrações de glutaciona reduzida (GSH) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	51
Figura 4.7	Efeito de antioxidantes sobre a redução dos níveis de glutaciona (GSH) induzida por D-serina em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens <i>in vitro</i>	52

Figura 4.8	Efeito <i>in vitro</i> da D-serina sobre a oxidação de uma solução comercial de glutathiona reduzida (GSH).....	53
Figura 4.9	Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em estriado de ratos jovens 30 minutos após a injeção.....	54
Figura 4.10	Efeitos da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre o conteúdo de grupos sulfidril a em estriado de ratos jovens 30 minutos após a injeção.....	55
Figura 4.11	Efeitos da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em homogeneizado de estriado de ratos jovens 30 minutos após a injeção.....	56
Figura 4.12	Efeitos da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre o estado antioxidante total do tecido (TAS) em homogeneizado de estriado de ratos jovens 30 minutos após a injeção.....	57
Figura 4.13	Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a atividade da glutathiona peroxidase (GPx) em estriado de cérebro de ratos jovens 30 minutos após a injeção.....	58
Figura 4.14	Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a atividade da catalase (CAT) em estriado de cérebro de ratos jovens 30 minutos após a injeção.....	59
Figura 4.15	Efeitos da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) em estriado de cérebro de ratos jovens 30 minutos após a injeção.....	60
Figura 4.16	Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em estriado de ratos jovens 2 horas após a injeção.....	61
Figura 4.17	Efeitos da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre o conteúdo de grupos sulfidril a em estriado de ratos jovens 2	

	horas após a injeção.....	62
Figura 4.18	Efeitos da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em homogeneizado de estriado de ratos jovens 2 horas após a injeção.....	63
Figura 4.19	Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a atividade da glutathiona peroxidase (GPx) em estriado de cérebro de ratos jovens 2 horas após a injeção.....	64
Figura 4.20	Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a atividade da catalase (CAT) em estriado de cérebro de ratos jovens 2 horas após a injeção.....	65
Figura 4.21	Efeitos da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) em estriado de cérebro de ratos jovens 2 horas após a injeção.....	66

RESUMO

O presente estudo investigou os efeitos *in vitro* e *ex vivo* da D-serina (D-Ser) sobre importantes parâmetros de estresse oxidativo, respectivamente, em córtex cerebral e estriado de ratos jovens.

Nos estudos com suplementação de D-Ser no meio de incubação, verificamos que este aminoácido induziu peroxidação lipídica, determinada pelo aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e da quimiluminescência, bem como dano oxidativo a proteínas, verificado através da formação de carbonilas e da oxidação de sulfidrilas. Além disso, a adição de varredores de radicais livres preveniu significativamente o dano oxidativo a lipídeos causado por D-Ser, sugerindo que os radicais livres estavam envolvidos neste efeito. A D-Ser também diminuiu significativamente os níveis de glutathiona reduzida (GSH) em córtex cerebral, diminuindo, portanto, a defesa antioxidante mais importante do cérebro. Finalmente, a D-Ser oxidou uma solução comercial de GSH em um meio desprovido de sobrenadante de córtex cerebral, indicando que este D-aminoácido possui uma ação oxidante direta sobre a glutathiona.

Nos estudos *ex vivo*, nos quais os animais foram injetados intraestriatalmente com 8 μ mol de D-Ser, verificamos que após 30 min da injeção a D-Ser aumentou significativamente os valores de TBA-RS (lipoperoxidação) e diminuiu as concentrações de GSH e do potencial antioxidante total (TAS) no estriado, enquanto o conteúdo de sulfidrilas não foi alterado. Esses resultados corroboram os resultados *in vitro*, indicando que a D-Ser provocou dano oxidativo lipídico e diminuiu as defesas antioxidantes não-enzimáticas no cérebro. Ao analisarmos a atividade das enzimas antioxidantes, observamos que a atividade da superóxido dismutase (SOD) estava significativamente diminuída, sem qualquer alteração das atividades da glutathiona peroxidase (GPx) e da catalase (CAT) 30 min após a administração de D-Ser. Por outro lado, 2 h após a administração de D-Ser, verificamos que a mesma não alterou os níveis de TBA-RS, bem como o conteúdo de sulfidrilas e as concentrações de GSH no estriado. Os resultados também revelaram que a mesma não alterou a atividade da GPx,

mas diminuiu a atividade da CAT e aumentou a atividade da SOD 2h após a sua administração.

Os resultados desse trabalho indicam que a D-Ser induz estresse oxidativo em córtex cerebral e estriado de ratos jovens. Dessa forma, poderia presumir-se que esse mecanismo patológico esteja envolvido, pelo menos em parte, no dano cerebral encontrado em pacientes afetados por distúrbios do metabolismo da D-Ser.

ABSTRACT

The present work investigated the *in vitro* and *ex vivo* effects of D-serine (D-Ser) on important parameters of oxidative stress in cerebral cortex of young rats. In studies with supplemental of D-Ser in the middle of incubation, found that the amino acid induced lipid peroxidation, determined by the increase of the thiobarbituric acid-reactive substances and chemiluminescence levels, as well as protein oxidative damage since carbonyl formation and sulfhydryl oxidation were enhanced by this amino acid. Furthermore, the addition of free radical scavengers significantly prevented D-Ser-induced lipid oxidative damage, suggesting that free radicals were involved in this effect. D-Ser also significantly diminished glutathione levels in cortical supernatants, decreasing therefore the major brain antioxidant defense. Finally, D-Ser oxidized a glutathione commercial solution in a medium devoid of brain supernatants, indicating that it behaved as a direct acting oxidant.

The *ex vivo* studies, where the animals were injected intrastrially with 8 μmol of D-Ser, we found that 30 minutes after D-Ser injection increased values of TBA-RS (lipoperoxidation) and decreased concentrations of GSH concentrations and of total antioxidant potential values were observed in the striatum, while the sulphhydryl content was not changed by D-Ser administration. These results corroborate the *in vitro* findings, indicating that D-Ser caused lipid oxidative damage and decreased the non-enzymatic antioxidant defenses in the brain. When we checked the activity of the antioxidants enzymes, we found that superoxide dismutase activity (SOD) was decreased, without any change in the activities of glutathione peroxidase (GPx) and of catalase (CAT). In turn, 2 hours after D-Ser injection, we found no alteration of TBA-RS levels, as well as the sulphhydryl content and the GSH concentrations in the striatum. We also found that D-Ser did not change the activity of GPx, but decreased the activity of CAT and increased the activity of SOD 2 hours after its injection.

Overall, the results indicate that D-Ser induces oxidative stress in cerebral cortex and striatum of young rats. Therefore, we may presume that this pathological mechanism may be involved at least in part in the cerebral damage found in patients with disorders of the D-Ser metabolism.

1. INTRODUÇÃO

1.1 D-aminoácidos

Inicialmente pensava-se que havia somente L-aminoácidos na natureza (FUCHS et al., 2006). Entretanto, a presença de D-aminoácidos (D-aa) foi observada em bactérias, vermes e outros invertebrados (CORRIGAN, 1969; SCOLARI & ACOSTA, 2007), bem como em tecidos de mamíferos, particularmente no cérebro (HASHIMOTO et al., 1992; CHOUINARD et al., 1993; NAGATA et al., 1994; SCOLARI & ACOSTA, 2007).

A função biológica dos D-aa nos mamíferos foi por muito tempo desconhecida (CORRIGAN, 1969; SCOLARI & ACOSTA, 2007) até que o D-aspartato foi detectado em altas concentrações no cérebro e teve sua atividade biológica esclarecida junto ao sistema glutamatérgico (DUNLOP et al., 1986; SCOLARI & ACOSTA, 2007). Mais tarde, níveis relativamente elevados de D-serina (D-Ser) foram também verificados no cérebro de mamíferos e, a partir de então, investigações foram focadas neste D-aa (HASHIMOTO et al., 1993).

1.2 D-serina

1.2.1 Origem e Degradação da D-serina

A D-serina é formada principalmente a partir de L-serina (L-Ser) através da enzima serina racemase (SR) (WOLOSKER et al., 1999; FOLTYN et al., 2005) que é regulada por múltiplos fatores. Piridoxal 5'-fosfato (PLP) é o principal cofator glial que estimula a atividade da SR, mas o magnésio (Mg^{2+}) e o ATP são também capazes de estimular a síntese de D-Ser por aumentar a atividade da SR (DE MIRANDA et al., 2002; NEIDLE & DUNLOP et al., 2002; FOLTYN et al., 2005; SCOLARI & ACOSTA, 2007). Além disso, o íon cálcio (Ca^{2+}) também ativa esta enzima em astrócitos (COOK et al., 2002; SCOLARI & ACOSTA, 2007), cuja atividade também é regulada por interações proteína-proteína (KIM et al., 2005; SCOLARI & ACOSTA, 2007).

Como vimos a SR converte L-Ser em D-Ser, podendo fazer o caminho inverso, porém com menor intensidade. Esta enzima, no entanto, também pode converter tanto a L- quanto a D-Ser em piruvato e amônia com perda de água (DE MIRANDA et al., 2002; NEIDLE & DUNLOP et al., 2002; STRISOVSKY et al., 2003; FOLTYN et al., 2005; SCOLARI & ACOSTA, 2007). Na realidade, esta outra via é mais ativa do que a que transforma L-Ser em seu enantiômero D-Ser. De fato, somente uma entre quatro moléculas de L-Ser são convertidas em D-Ser pela SR, enquanto as outras três são convertidas em piruvato (STRISOVSKY et al., 2003; STRISOVSKY et al., 2005; FOLTYN et al., 2005; SCOLARI & ACOSTA, 2007). O piruvato entra no ciclo de Krebs através de várias rotas, promovendo a síntese de ATP ou sendo convertido em lactato pela enzima lactato desidrogenase. Além disso, a rota do piruvato através do ciclo de Krebs também é importante para a síntese de vários aminoácidos importantes para células gliais e neurônios, tais como o GABA (ácido gama-aminobutírico), o glutamato e a glutamina, originários de α -cetoglutarato. Por sua vez, a conversão de piruvato em lactato fornece uma ligação entre neurônios e glia, visto que o lactato é um precursor energético importante para neurônios, especialmente durante períodos de hiperatividade sináptica, estresse oxidativo ou neurotoxicidade (FOLTYN et al., 2005; SCOLARI & ACOSTA, 2007).

A figura 1.1 mostra um modelo molecular da serina racemase.

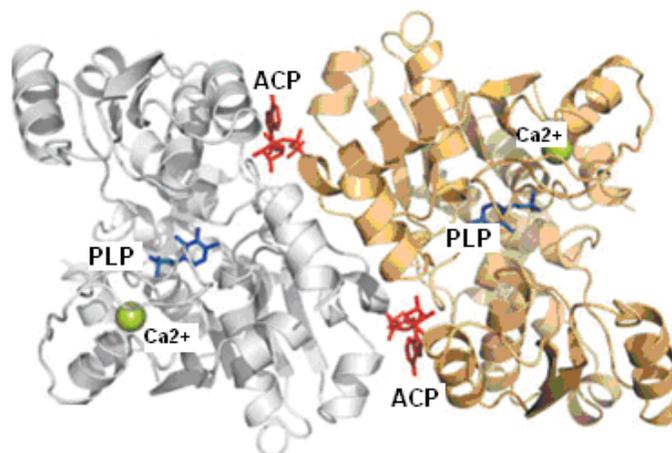


Figura 1.1 - Modelo molecular da serina racemase em seres humanos (BAUMGART et al., 2007). Na figura, estão assinalados os íons cálcio (esferas amarelas), o PLP (em azul) e o AMP, ácido fosfometilfosfórico, (em vermelho).

A degradação da D-serina é realizada pela enzima D-aminoácido oxidase (DAAO) que é uma flavoproteína peroxisomal localizada em astrócitos (NEIMS et al., 1966; WEIMAR & NEIMS, 1977; SCHELL et al., 1995; MORENO et al., 1999; URAI et al., 2002; NISHIKAWA, 2005; SCOLARI & ACOSTA, 2007). No cérebro de ratos, a distribuição e o desenvolvimento pós-natal da DAAO estão inversamente correlacionados com as concentrações de D-Ser nas várias estruturas cerebrais. No rato, a atividade de DAAO aumenta rapidamente no cerebelo, ponte e medula espinhal após o nascimento até o décimo dia de vida (WEIMAR & NEIMS, 1977; HORIIKE et al., 1994; NISHIKAWA, 2005), após o que começa a diminuir essa atividade (NAGATA et al., 1994; HASHIMOTO et al., 1995; NISHIKAWA, 2005).

A DAAO converte a D-Ser em piruvato, sendo estéreo-seletiva, pois não tem efeito sobre L-aminoácidos e também sobre aminoácidos dicarboxílicos (PILONE, 2000; SCOLARI & ACOSTA, 2007). Em estudos utilizando camundongos Knock-out deficientes no gene da DAAO, verificou-se que os animais mutantes apresentaram um aumento significativo nos níveis de D-Ser, especialmente no pedúnculo cerebral e cerebelo, duas regiões usualmente contendo baixos níveis de D-Ser em animais normais não mutantes (MORIKAWA et al., 2001; SCOLARI & ACOSTA, 2007). Por outro lado, as concentrações de D-Ser não variaram significativamente nas áreas frontais do cérebro dos animais Knock-out, sugerindo que nesta região os níveis de D-Ser são regulados por um outro mecanismo (MORIKAWA et al., 2001; SCOLARI & ACOSTA, 2007). Presume-se que a principal via de degradação da D-Ser nesta área seria pela formação de piruvato catalisada pela SR, como explicado anteriormente (FOLTYN et al., 2005; SCOLARI & ACOSTA, 2007).

1.2.2 Distribuição e Metabolismo da D-serina no Cérebro de Mamíferos

A D-serina está predominantemente concentrada no cérebro particularmente nas áreas frontais, incluindo o córtex cerebral, o hipocampo e o estriado, podendo também ser encontrada em menores concentrações no diencéfalo, cérebro médio, ponte, medula e cerebelo (HASHIMOTO et al., 1993;

NISHIKAWA, 2005). A distribuição preferencial de D-Ser na região frontal está associada com os receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA) e particularmente com as subunidades R2B de mRNA (WATANABE et al., 1992; CHOUINARD et al., 1993; HASHIMOTO et al., 1993; NAGATA et al., 1994; HAMASE et al., 1997; NISHIKAWA, 2005).

No que se refere à ontogenia, as concentrações cerebrais mais altas de D-Ser nos neonatos ocorre no cerebelo, enquanto nos animais adultos nas partes frontais do cérebro (SCHELL et al., 1995; SCHELL et al., 1997; SCOLARI & ACOSTA, 2007). Por outro lado, as concentrações cerebelares de D-Ser no cérebro de adultos são praticamente indetectáveis (SCHELL et al., 1995; SCOLARI & ACOSTA, 2007). Estas alterações durante o desenvolvimento cerebral são similares às que ocorrem na distribuição da subunidade R2B do mRNA dos receptores NMDA (WATANABE et al., 1992; HASHIMOTO et al., 1993; NAGATA et al., 1994; HASHIMOTO et al., 1995). A presença de D-Ser tem sido verificada através de estudos imunológicos (imunoreatividade) em astrócitos, oligodendrócitos e corpos celulares, dendritos e axônios de neurônios (SCHELL et al., 1995; YASUDA et al., 2001; NISHIKAWA, 2005).

A D-Ser é também detectada no líquido extracelular, no córtex frontal médio, estriado e cerebelo e sua liberação por células astrogliais para o meio extracelular é induzida por kainato e ácido (S)- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA), dependendo também de íons cálcio, do SNARE (fator solúvel de ligação ao receptor protéico sensível a N-etilmaleimida), bem como de glutamato e ATP (MOTHET et al., 2005; NISHIKAWA, 2005). Contudo, a relação entre a liberação induzida e a liberação espontânea de D-Ser precisa ser melhor elucidada.

A captação de D-Ser para o interior das células neurais, estudada em homogeneizados de cérebro de ratos e em células C6, é feita por um transportador sódio-dependente ou independente, que é saturável e sensível à temperatura, sendo diferente de transportadores conhecidos que atuam no SNC (Hayashi et al., 1997; Yamamoto et al., 2001; Ribeiro et al., 2002). Já o

transportador sódio-independente Asc1 para aminoácidos neutros que apresenta uma alta afinidade para a L-serina, a L-cisteína e a L-alanina, pode também captar a D-Ser (Fukasawa et al., 2000).

1.2.3 Funções da D-serina no Cérebro

1.2.3.1 D-serina como Co-agonista de Receptores NMDA

O sistema nervoso central (SNC) é formado por neurônios e células gliais, sendo estas últimas as mais numerosas (NEDERGAARD et al., 2003). As células gliais estão associadas com neurônios, permitindo uma comunicação bidirecional entre estas células (VOLTERRA & HARRIS, 1999; HAYDON, 2001; VOLTERRA & MELDOLESI, 2005). Essa associação entre a glia e os neurônios é a base para um conceito emergente que propõe a glia como um componente dinâmico na sinaptogênese (PFRIEGER, 2002; OLIET et al., 2004). Acredita-se que as funções desempenhadas pelos astrócitos nas sinapses são mediadas por neuromoduladores e gliotransmissores liberados pelo meio extracelular. Embora o glutamato e o ATP sejam os transmissores gliais mais conhecidos, um papel importante tem sido proposto para a D-Ser (WOLOSKER et al., 1993).

Receptores do tipo NMDA são ionotrópicos, necessitando de glutamato (neurotransmissor) e glicina (co-agonista) para serem ativados (JOHNSON & ASCHER, 1987; KLECKNE & DINGLEDINE, 1988; OLIET & MOTHET, 2008). Recentemente, verificou-se que o sítio de ligação de glicina pode ser também ativado por D-Ser, além de glicina. Foi também verificado que em várias áreas do cérebro o ligante mais importante do sítio da glicina junto aos receptores NMDA é a D-Ser e não a glicina. Nestas regiões, a D-Ser é liberada por células gliais, desempenhando um papel fundamental na regulação dos receptores NMDA dependentes de D-Ser para sua ativação, influenciando decisivamente os processos de transmissão sináptica, plasticidade sináptica, atividade rítmica, ativação de um segundo mensageiro precursor, expressão gênica e também atuando nos processos fisiopatológicos da excitotoxicidade e neurodegeneração.

A primeira indicação de que a D-Ser poderia desempenhar uma função importante nos receptores do tipo NMDA veio da observação de que a localização

deste D-aa em astrócitos é a mesma dos receptores NMDA (SCHELL et al., 1997; SCHELL et al., 2004; OLIET & MOTHET, 2008). Estudos *in vitro* subseqüentes revelaram que a D-Ser era liberada por astrócitos concomitantemente com a ativação de receptores glutamatérgicos (SCHELL et al., 1995; MOTHET et al., 2005), sugerindo que, em algumas regiões do cérebro, o glutamato liberado de terminais nervosos possa desencadear a liberação de D-Ser por células gliais que, por sua vez, podem modular receptores NMDA em neurônios adjacentes (OLIET & MOTHET, 2008).

1.2.3.2 D-Serina na Interação Glia / Neurônio

Várias observações indicam que D-Ser está implicada na interação entre glia e neurônios necessária para o controle da estimulação dos receptores do tipo NMDA no cérebro, embora as inter-relações e os mecanismos exatos necessitam ser melhor esclarecidos (NISHIKAWA, 2005). Assim, a imunoreatividade substancial da D-Ser em células gliais incluindo astrócitos sugere que a mesma possa ser liberada como um neuromodulador destas células gliais (MOTHET et al., 2005). Além disso, estudos mostrando a presença de uma serina racemase com atividade imunoreativa, bem como de captação e liberação de D-Ser, além da presença do mRNA de DAAO nos astrócitos e a dependência da síntese de D-Ser nos astrócitos sinalizam a importância desse D-aa para a neurotransmissão (WOLOSKER et al., 1999; URAI et al., 2002; YANG et al., 2003; MOTHET et al., 2005).

1.2.3.3 D-serina na Formação dos Circuitos Neurais

Foi verificado no cerebelo que a D-Ser é importante na migração de células neurais, enquanto a degradação seletiva de D-Ser por DAAO e a inibição farmacológica da atividade da serina racemase dificultam esse processo (KIM et al., 2005). Estes achados indicam o envolvimento da D-Ser do cérebro na formação de circuitos neurais possivelmente via estimulação de receptores NMDA durante estágios do desenvolvimento do SNC (NISHIKAWA, 2005).

1.2.4 D-serina em Doenças

Tendo em vista que a D-Ser atua como co-agonista de receptores NMDA e considerando a importância desses receptores para a plasticidade e o desenvolvimento do SNC, acredita-se que alterações no metabolismo da D-Ser possam associar-se com várias patologias, tais como doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas.

Assim, é possível que a hipofunção de receptores NMDA que se acredita ocorrer na esquizofrenia possa estar relacionada à falta de sinalização pela D-Ser (GOFF & COYLE, 2001; WOLOSKER et al., 2008). Neste particular, antagonistas de NMDA, tais como a fenilciclidina, induzem sintomas de esquizofrenia em indivíduos voluntários saudáveis, além de provocar transtornos psiquiátricos e delírios em pacientes esquizofrênicos (GOFF & COYLE, 2001; COYLE et al., 2003). Baseados na hipótese de hipofunção de receptores NMDA, vários ensaios clínicos foram realizados para avaliar a eficácia da estimulação dos receptores NMDA na esquizofrenia. Foi verificado que a administração de D-Ser ameniza os sintomas da esquizofrenia quando associada com neurolépticos convencionais (TSAI et al., 1998; HERESCO-LEVY et al., 2005). A D-Ser também antagoniza o comportamento estereotipado e a ataxia causada por antagonistas de receptores NMDA em camundongos (CONTRERAS, 1990).

Além de ser uma forma promissora de tratamento farmacológico para a esquizofrenia, estudos recentes indicam que os níveis de D-Ser endógena podem também estar alterados nesta doença. Pacientes esquizofrênicos apresentam uma proporção maior de L-Ser relativamente à D-Ser no sangue e líquido cérebro-espinhal (HASHIMOTO et al., 2003; BENDIKOV et al., 2007). O possível envolvimento de D-Ser na esquizofrenia foi destacado também por estudos genéticos apresentando polimorfismos nos genes de serina racemase (MORITA et al., 2007) e da enzima que metaboliza a D-Ser, a D-aminoácido oxidase (CHUMAKOV et al., 2002). A confirmação desses estudos em populações maiores será importante para determinar a função exata da D-Ser endógena na fisiopatologia de esquizofrenia.

A potencialização a longo prazo (LTP) da atividade sináptica no hipocampo tem demonstrado desempenhar um papel importante na formação da memória

(NEVES et al., 2008). Por outro lado, ratos idosos apresentam uma diminuição acentuada das concentrações de D-Ser e da expressão de serina racemase no hipocampo (MOTHET et al., 2006) associada à alteração de LTP, que é revertida pela adição de D-Ser exógena (JUNJAUD et al., 2006). No entanto, a LTP não é aumentada por suplementação de D-Ser exógena em ratos jovens. Deste modo, é possível que o comprometimento da LTP observada em ratos idosos seja causada por déficits específicos de síntese de D-Ser (WOLOSKER et al., 2008). Embora não se possa concluir definitivamente, é possível que níveis cerebrais baixos de D-Ser endógena possam comprometer a LTP levando a déficit cognitivo.

A superprodução ou liberação excessiva de glutamato tem sido amplamente verificada em várias doenças neurodegenerativas agudas e crônicas. Os efeitos nocivos do glutamato provavelmente devem-se, principalmente, à ativação excessiva de receptores NMDA, levando ao influxo maciço de cálcio na célula com posterior ativação de enzimas lipolíticas e proteolíticas e da cascata apoptótica (DANYSZ & PARSONS, 1998). Assim, a super-estimulação de receptores NMDA parece ser fundamental para a morte celular que ocorre após um acidente vascular cerebral, bem como em doenças neurodegenerativas (CHOI & ROTHMAN, 1990).

Neste particular, bloqueadores de receptores NMDA são considerados neuroprotetores em modelos animais de acidente vascular cerebral, mas não foram bem tolerados em ensaios clínicos devido aos efeitos secundários causados pelo bloqueio de receptores NMDA, provocando sintomas como, por exemplo, alucinações (LIPTON, 2006; PARSONS et al., 2007). Recentemente, inibidores de receptores NMDA de baixa afinidade, como a memantina, tem sido propostos como uma alternativa para bloquear receptores NMDA de alta afinidade, sendo bem tolerados pelos pacientes (LIPTON, 2006; PARSONS et al., 2007). Similarmente aos antagonistas de receptores NMDA de baixa afinidade, a inibição da serina racemase (SR) oferece uma abordagem mais fisiológica para reduzir a ativação de receptores NMDA, podendo representar uma nova estratégia para a prevenção de danos causados por acidente vascular cerebral e morte celular em doenças neurodegenerativas (WOLOSKER et al., 2008).

A produção ou liberação excessiva de D-Ser pode também estar envolvida em algumas formas de neurodegeneração crônica. Os níveis de D-Ser e da serina racemase estão muito aumentados na medula espinhal de pacientes com esclerose lateral amiotrófica (ALS) (SASABE et al., 2007). Embora a morte das células neurais motoras em ALS seja principalmente atribuída à estimulação excessiva de receptores AMPA (CLEVELAND & ROTHSTEIN, 2001), um estudo recente indica que a D-Ser endógena pode mediar a morte destas células por estimulação excessiva de receptores NMDA na medula espinhal de camundongos com ALS (SASABE et al., 2007). Em camundongos transgênicos com ALS e mutação no gene G93A da superóxido dismutase 1, a microglia ativada parece ser a principal origem da D-Ser espinhal, constituindo um potencial alvo terapêutico para a ALS (SASABE et al., 2007). Neste particular, foi verificado que a ativação da microglia por estímulo inflamatório induz a expressão da serina racemase (WU & BARGER, 2004; SASABE et al., 2007). Além disso, a remoção da D-Ser endógena de cultura de medula espinhal de camundongos transgênicos com ALS demonstrou proteger os neurônios motores contra a morte celular mediada por receptores NMDA, o que indica o envolvimento da D-Ser na degeneração dos neurônios motores nesta doença (SASABE et al., 2007). Por outro lado, é possível que a produção excessiva de D-Ser por células gliais na ALS possa estar envolvida na fisiopatogenia desta doença, visto que as células gliais ativadas podem atuar similarmente a macrófagos (BRUIJN et al., 2004). Neste contexto, inibidores de serina racemase poderiam representar uma nova estratégia neuroprotetora na ALS (WOLOSKER et al., 2008).

1.3 Radicais Livres

1.3.1 Definição

Um radical livre é qualquer espécie química capaz de existir de forma independente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados (SOUTHORN & POWIS, 1988; HALLIWELL, 2001; HALLIWELL, 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007a). O desemparelhamento de elétrons,

situação energeticamente instável, é o que confere alta reatividade a essas espécies. Os radicais livres podem ser formados pela perda de um elétron de um não-radical ou pelo ganho de um elétron por um não-radical. Radicais podem também ser formados em um processo de fissão, no qual uma ligação covalente é quebrada e cada elétron do par compartilhado permanece com cada um dos átomos envolvidos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). Quando um radical livre reage com um composto não-radical, outro radical livre pode ser formado. Assim, a presença de um único radical pode iniciar uma seqüência de reações em cadeia de transferência de elétrons (redox) (MAXWELL, 1995). Nas reações em cadeia induzidas pelos radicais livres, um radical reativo leva à formação de um produto que também é um radical livre e que, por sua vez, reage produzindo um terceiro radical.

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o oxigênio molecular (O_2) sofre redução tetravalente, com incorporação de quatro elétrons, resultando na formação de água (H_2O). No entanto, aproximadamente 5% do oxigênio utilizado na cadeia respiratória mitocondrial não é completamente reduzido à água, podendo ser convertido a intermediários reativos como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxila (OH^{\bullet}), e também a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), processo esse que pode ser exacerbado em condições patológicas (BOVERIS, 1998).

O termo genérico “Espécies Reativas de Oxigênio” (ERO) é usado para incluir não só os radicais formados pela redução do O_2 , o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}), mas também alguns não-radicais derivados do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio *singlet* (1O_2) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007b). Além dessas, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo o óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) os principais representantes.

As ERO e ERN ocorrem tanto em processos fisiológicos quanto patológicos do organismo. Fisiologicamente, essas espécies reativas apresentam diversas funções (BERGENDI *et al.*, 1999). Assim, um aumento da liberação local de radicais livres pode ser benéfico, como é o caso da liberação de espécies tóxicas oxidantes pelos neutrófilos, que podem atuar na defesa do hospedeiro

contra uma infecção (DELANTY & DICHTER, 1998; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007a). Participam ainda de processos de sinalização celular e também estão envolvidos na síntese e regulação de algumas proteínas (WARD & PETERS, 1995).

Por outro lado, quando formadas em excesso, essas espécies altamente reativas têm o potencial de oxidar moléculas (MAXWELL, 1995). Com relação aos efeitos prejudiciais das reações oxidantes ao organismo, os radicais livres podem promover lipoperoxidação, causar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), reagir com proteínas, levando à sua inativação e conseqüente alteração de sua função e reagir com o DNA e RNA, levando à mutações somáticas e à distúrbios de transcrição (DELANTY & DICHTER, 1998; HALLIWELL & WHITEMAN, 2004), dentre outros efeitos.

1.3.2 Lipoperoxidação

Antes de ser vista como um mecanismo de dano oxidativo, a lipoperoxidação deve ser considerada como um processo fisiológico contínuo que ocorre normalmente nas membranas celulares. Além de ser um fator de renovação da membrana, este processo é essencial na síntese de prostaglandinas e leucotrienos, bem como na fagocitose e pinocitose. No entanto, por serem formadas em grande parte por lipídios insaturados e proteínas, as membranas são particularmente vulneráveis ao ataque oxidativo. Assim, quando a produção de espécies reativas aumenta acima da capacidade de detoxificação, a lipoperoxidação acelerada acarretará profundas alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Isso irá causar perda de seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos como o malondialdeído e o 4-hidroxinonenal, dentre outros eventos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

A lipoperoxidação possui etapas de iniciação, propagação e terminação (Figura 1.2) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007a), podendo ser catalisada por íons ferro, por conversão de hidróxidos lipídicos (LOOH) em radicais altamente reativos capazes de iniciar nova cadeia de reações, denominada ramificação.

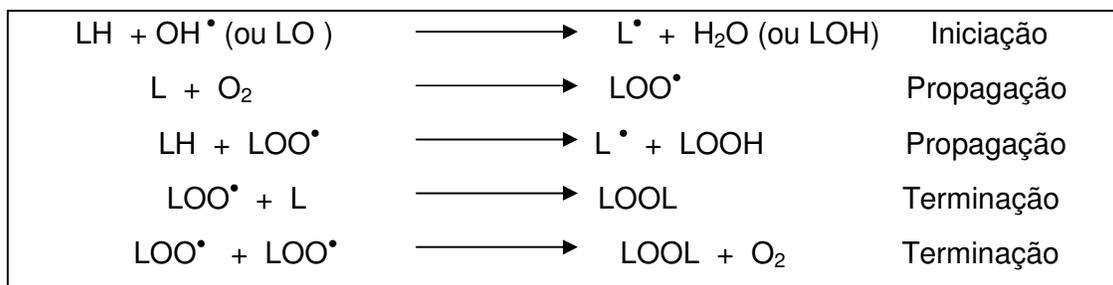


Figura 1.2 - Reações de iniciação, propagação e terminação da lipoperoxidação (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

A iniciação é causada pelo ataque a um lipídio de membrana por parte de qualquer espécie que tenha reatividade suficiente para abstrair um átomo de hidrogênio de um grupo metileno ($-CH_2-$). Nesse contexto, radicais hidroxila podem prontamente iniciar a lipoperoxidação. Já que o átomo de hidrogênio tem apenas um elétron, a retirada de H^\bullet de um grupo metileno deixa um elétron desemparelhado no carbono ($-\dot{C}H-$). Esse radical formado é geralmente estabilizado por um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado. O destino mais provável desse radical é reagir com o O_2 , formando um radical peroxila (ROO^\bullet). Os radicais peroxila, por sua vez, são capazes de subtrair um próton de outra molécula lipídica, sendo esta fase conhecida como a fase de propagação. O radical de carbono formado pode reagir com o O_2 para formar outro radical peroxila, e assim sucessivamente. A retirada de um hidrogênio de outro lipídio por parte do radical peroxila gerará um hidroperóxido lipídico ($LOOH$). O término da reação poderá ocorrer quando dois radicais produzidos nas etapas anteriores reagirem entre si, formando um produto estável (HALLIWELL, 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

1.3.3 Defesas Antioxidantes

Para evitar os efeitos danosos das espécies reativas, existem mecanismos eficientes para sua eliminação, como a produção endógena de enzimas antioxidantes e alguns antioxidantes não-enzimáticos. Embora diferindo na

composição, as defesas antioxidantes estão amplamente distribuídas no organismo e compreendem:

- * agentes que removem cataliticamente os radicais livres, como as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, entre outras;

- * proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes (íons de ferro e cobre, por exemplo), ao se ligarem aos mesmos como as transferrinas;

- * proteínas que protegem biomoléculas de dano oxidativo por outros mecanismos;

- * agentes de baixo peso molecular que aprisionam espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como glutathione, α -tocoferol, ácido ascórbico e a bilirrubina.

1.3.3.1 Defesas Antioxidantes Enzimáticas

- Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD catalisa a reação de dismutação de dois radicais superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio (Figura 1.3) e é chamada de defesa primária contra o estresse oxidativo, já que o radical superóxido é um forte iniciador de reações em cadeia (MARKS *et al.*, 1996). O peróxido de hidrogênio formado é menos reativo que o radical superóxido e é degradado posteriormente por outros sistemas, como a catalase e a glutathione peroxidase (FRIDOVICH, 1975).

Existem três formas de SOD com diferentes grupos prostéticos em sua composição. A forma SOD cobre-zinco está presente principalmente no citosol em praticamente todas as células eucarióticas, a SOD manganês na matriz mitocondrial, enquanto a SOD ferro em plantas e bactérias (MC CORD & FRIDOVICH, 1969; FRIDOVICH, 1975).

SOD

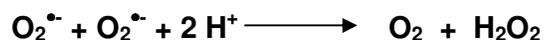


Figura 1.3 - Dismutação do radical superóxido pela SOD (MARKS *et al.*, 1996).

- Catalase (CAT)

A CAT é uma hemoproteína que catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio (Figura 1.4) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Ela

está localizada principalmente no peroxissoma e em menor quantidade no citosol e na fração mitocondrial da célula (MARKS *et al.*, 1996).



Figura 1.4 - Decomposição do peróxido de hidrogênio pela CAT (MARKS *et al.*, 1996).

- Glutathione Peroxidase (GPx)

A GPx catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos para seus álcoois correspondentes (Figura 1.5) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). O grupo sulfidril da glutathione reduzida (GSH) atua como doador de elétrons e é oxidado para a forma glutathione oxidada (GSSG). Há dois tipos de glutathione peroxidase: uma requer selênio cisteína (PROHASKA *et al.*, 1977) como co-fator, podendo ser encontrada no citosol e na mitocôndria, e outra que é independente de selênio e localiza-se no citosol (MARKS *et al.*, 1996). A GPx atua acoplada à enzima glutathione redutase (GR), que catalisa a redução de GSSG. Esta redução requer NADPH como coenzima (Figura 1.6) (MARKS *et al.*, 1996).



Figura 1.5 - Decomposição de peróxido de hidrogênio, ou outros lipoperóxidos, pela GPx (MARKS *et al.*, 1996).



Figura 1.6 - Redução da GSSG pela GR (MARKS *et al.*, 1996).

1.3.3.2 Defesas Antioxidantes Não-Enzimáticas

- Glutathione reduzida

A glutathione reduzida (GSH) é um tripeptídeo sintetizado a partir de L-glutamato, L-cisteína e glicina (SIES, 1999). A capacidade redutora da GSH é

determinada pela presença do grupamento tiólico (-SH) da cisteína. Na maioria das células, a GSH é encontrada em elevadas concentrações (mM) no meio intracelular e atua como transportadora e reservatório de cisteína, além de participar da detoxificação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e produtos de lipoperoxidação. A GSH também é requerida para a síntese de DNA, proteínas e algumas prostaglandinas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000) e tem papel na transdução de sinal, na expressão gênica e na apoptose (SIES, 1999).

Apesar de citar os demais antioxidantes não-enzimáticos, estes não serão detalhados, visto que não foram abordados neste estudo.

1.4 Estresse Oxidativo

Organismos saudáveis em condições normais produzem espécies reativas, que em sua maior parte são controladas pelos sistemas de defesa antioxidante. No entanto, em determinadas condições patológicas pode haver um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e as defesas antioxidantes, favorecendo a ocorrência do estresse oxidativo.

Assim, o termo “estresse oxidativo” é usado para se referir à situação na qual a geração de espécies reativas ultrapassa a capacidade das defesas antioxidantes disponíveis. Pode resultar tanto de uma diminuição das defesas antioxidantes quanto de uma produção aumentada de oxidantes, bem como da liberação de metais de transição ou a combinação de quaisquer desses fatores (HALLIWELL, 2006).

O estresse oxidativo pode promover adaptação, dano ou morte celular:

* *Adaptação*: as células podem tolerar um estresse oxidativo moderado, que geralmente resulta em *up-regulation* da síntese de sistemas de defesa antioxidante a fim de restaurar o balanço oxidante/antioxidante. Apesar disso, nem sempre o estresse oxidativo precisa envolver defesas antioxidantes aumentadas.

* *Dano celular*: o estresse oxidativo pode danificar alvos moleculares (DNA, proteínas, carboidratos e lipídios) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000;

HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007b). A resposta à injúria pode ser reversível: a célula entra em um estado de homeostase alterado temporário ou prolongado que não leva à morte celular.

* *Morte celular*: pode ocorrer tanto por necrose quanto por apoptose. Na morte celular por necrose, a célula incha e se rompe, liberando seu conteúdo para o meio extracelular. Pode haver a liberação de antioxidantes, como a catalase e a glutatona reduzida, e também de pró-oxidantes, como os íons cobre e ferro e proteínas do grupo HEME, agentes esses que podem afetar as células adjacentes, podendo até mesmo induzi-las a um estresse oxidativo. Já na apoptose, o mecanismo intrínseco de morte celular programada é ativado e não há a liberação do conteúdo celular. A apoptose pode estar acelerada em certas doenças, como as desordens neurodegenerativas, havendo envolvimento do estresse oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007a).

Além da indução de necrose e apoptose, o estresse oxidativo pode levar ao aumento da lipoperoxidação, cujos produtos malondialdeído e 4-hidroxinonenal, entre outros são altamente neurotóxicos, bem como ao dano oxidativo protéico, provocando a inibição da atividade de diversas enzimas antioxidantes, podendo provocar alteração da função celular e do DNA, ao causar alteração de bases púricas e pirimídicas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007a).

1.5 Estresse Oxidativo e Doenças Neurodegenerativas

Numerosas hipóteses têm sido propostas para explicar a fisiopatologia das doenças de Alzheimer, Huntington e Parkinson (ALEXI et al., 2000; MENDÉZ-ÁLVAREZ et al., 2001; BEHL et al., 2002; CHONG, et al., 2005; HALLIWELL, 2006), sem, entretanto, obter até o momento uma explicação completamente satisfatória para explicar o dano cerebral dessas doenças. No entanto, acredita-se que possíveis mecanismos envolvam deficiência no metabolismo energético, estresse oxidativo e neurotoxicidade mediada por receptores glutamatérgicos do

tipo NMDA (excitotoxicidade), ou, possivelmente, um somatório desses fatores (ROSE & HENNEBERRY, 1994).

O cérebro é altamente dependente de energia para o seu funcionamento normal e a mitocôndria é a estrutura intracelular responsável pela produção dessa energia. Para a produção eficiente de energia na forma de ATP, a mitocôndria possui uma alta demanda por oxigênio, já que utiliza uma grande quantidade de O₂ em uma massa de tecido relativamente pequena, o que o torna altamente susceptível à ação de espécies reativas. Outros fatores também contribuem para essa susceptibilidade como o alto conteúdo de ferro presente no cérebro, que pode favorecer a lipoperoxidação; o seu alto conteúdo lipídico, principalmente lipídios de cadeia lateral poliinsaturada que são extremamente susceptíveis à lipoperoxidação; e à sua modesta defesa antioxidante, sendo os níveis de catalase particularmente baixos em muitas regiões cerebrais (HALLIWELL, 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007a). Além disso, uma disfunção mitocondrial pode ocorrer por diminuição da atividade dos complexos da cadeia respiratória com um conseqüente prejuízo no transporte de elétrons, o que leva a uma dispersão dos elétrons na forma de radicais livres potencialmente danosos à célula.

Numerosas evidências sugerem que os radicais livres e o estresse oxidativo possam estar envolvidos na patogênese do dano neurológico em várias doenças neurodegenerativas. Estudos demonstraram uma diminuição na atividade do complexo I da cadeia respiratória em cérebros *postmortem* de pacientes portadores de doença de Parkinson. Essa inibição do complexo I pode acarretar a geração de espécies reativas, tais como ânion superóxido, radicais hidroxila e peroxinitrito, as quais poderiam causar um prejuízo ainda maior na cadeia transportadora de elétrons. Dessa forma, é possível que o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial formem um ciclo vicioso na doença de Parkinson (SCHAPIRA *et al.*, 1989, 1990 a, b; JANETSKY *et al.*, 1994; GU *et al.*, 1998).

Na doença de Alzheimer, a mais comum dentre as doenças neurodegenerativas, é possível que o estresse oxidativo tenha um papel chave na morte neuronal. Tem sido proposto que o peptídeo β -amilóide, o formador das

chamadas placas senis, tenha a capacidade de gerar radicais livres espontaneamente. Estudos *in vivo* também evidenciaram um dano oxidativo em cérebros humanos *postmortem* com doença de Alzheimer através da observação de aumento de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdGA), produtos de oxidação de outras bases e de RNA, carbonilas de proteínas, nitrotirosina e marcadores de peroxidação lipídica (SMITH *et al.*, 1991; MARKESBERY *et al.*, 1999; NOUROOZ-ZADEH *et al.*, 1999; LOVELL *et al.*, 2000).

Por outro lado, vários estudos têm evidenciado um dano oxidativo importante em pacientes portadores da doença de Huntington, particularmente representado pela formação de 3-nitrotirosina nas áreas afetadas (ALEXI *et al.*, 2000). Entretanto, o dano oxidativo observado nessa doença aparentemente tem menor importância do que nas doenças de Parkinson e Alzheimer. Recentemente foi verificado que vários metabólitos acumulados em alguns EIM produzem estresse oxidativo no cérebro de animais experimentais (LATINI *et al.*, 2007; SCHUCK *et al.*, 2007; Feksa *et al.*, 2008; KESSLER *et al.*, 2008; LEIPNITZ *et al.*, 2008a; LEIPNITZ *et al.*, 2008b; ZUGNO *et al.*, 2008) e em seres humanos (SITTA *et al.*, 2006; DEON *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2007; BARSCHAK *et al.*, 2008a; BARSCHAK *et al.*, 2008b; DEON *et al.*, 2008) indicando que compostos acumulados nestas doenças possam causar dano oxidativo.

Considerando a importância dos radicais livres e do estresse oxidativo como mecanismo fisiopatogênico de doenças neurodegenerativas, surgiram diversas drogas para a terapia de pacientes portadores dessas doenças baseadas em um mecanismo antioxidante, tais como sequestradores de ânion superóxido, análogos da vitamina E, inibidores da peroxidação lipídica, inibidores da enzima óxido nítrico sintase, entre outras.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar os efeitos *in vitro* e *ex vivo* da D-serina sobre parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral e estriado de ratos jovens, respectivamente, na expectativa de contribuir para o esclarecimento do papel fisiológico e patológico deste D-aminoácido no sistema nervoso central.

2.2 Objetivos Específicos

a) Determinar os efeitos *in vitro* da D-serina sobre a peroxidação lipídica, medida através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e da quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida.

b) Determinar os efeitos *in vitro* da D-serina sobre a oxidação de proteínas, determinada através da formação de carbonilas e da medida de grupamentos sulfidríla em homogeneizado de córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida.

c) Determinar os efeitos *in vitro* da D-serina sobre as defesas antioxidantes não enzimáticas, medidas pelo conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida.

d) Determinar os efeitos da administração intraestriatal *in vivo* de D-serina sobre a peroxidação lipídica, medida através dos níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de estriado de cérebro de ratos de 30 dias de vida, 30 minutos ou 2 horas após a injeção.

e) Determinar os efeitos da administração intraestriatal *in vivo* de D-serina sobre a oxidação de proteínas, medida através do conteúdo de grupamentos

sulfidrilas em homogeneizado de estriado de cérebro de ratos de 30 dias de vida, 30 minutos ou 2 horas após a injeção.

f) Determinar os efeitos da administração intraestriatal *in vivo* de D-serina sobre as concentrações de glutatona reduzida (GSH) em homogeneizado de estriado de cérebro de ratos de 30 dias de vida, 30 minutos ou 2 horas após a injeção.

g) Determinar os efeitos da administração intraestriatal *in vivo* de D-serina sobre a atividade das enzimas antioxidantes glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em homogeneizado de estriado de cérebro de ratos de 30 dias de vida, 30 minutos ou 2 horas após a injeção.

h) Determinar os efeitos da administração intraestriatal *in vivo* de D-serina sobre o estado antioxidante total (TAS) do tecido em homogeneizado de estriado de cérebro de ratos de 30 dias de vida, 30 minutos após a injeção.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram de grau de pureza pró-análise (PA).

O aminoácido D-serina foi sempre dissolvido e diluído em tampão fosfato de sódio 20 mM, contendo 140 mM de cloreto de potássio, pH 7,4, no dia da realização dos ensaios.

3.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 30 dias de vida do Biotério do Departamento de Bioquímica do ICBS, UFRGS. Os animais tiveram livre acesso à água e à ração comercial (Supra, POA, RS, Brasil) contendo 20,5% de proteína (predominantemente de soja), 54% de carboidratos, 4% de lipídios, 4,5% de fibras, 7% cinzas e 10% de umidade. Eles foram mantidos em ciclo claro-escuro de ± 12 horas a uma temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$.

3.3 Estudos *in vitro*

3.3.1 Preparação de Homogeneizados de Córtex Cerebral

Os animais foram sacrificados por decapitação sem anestesia. O cérebro foi rapidamente removido e colocado sobre placa de Petri em gelo para a dissecação do córtex cerebral. O córtex cerebral foi posteriormente pesado e homogeneizado em tampão fosfato de sódio 20 mM contendo cloreto de potássio 140 mM, pH 7,4, na proporção de 1:10 (peso/volume) e o homogeneizado obtido foi levado à centrifugação a 750 g durante 10 min a 4°C . O sobrenadante foi empregado para a medição dos diferentes parâmetros de estresse oxidativo. Finalmente, foram retiradas alíquotas para a realização de uma pré-incubação de 1 hora a 37°C na ausência de D-serina (grupo controle) ou presença da mesma (grupos teste) nas concentrações de 0,01, 0,1, 1 ou 5 mM.

Em alguns experimentos utilizamos os antioxidantes creatina (CRE, 3 mM), N-acetilcisteína (NAC, 1mM), glutathiona reduzida (GSH, 750 μ M), melatonina (MEL, 750 μ M), trolox (TRO, α -tocoferol, 5 μ M), a combinação de superóxido dismutase (SOD) mais catalase (CAT) (15 um/mL cada), ou L-carnitina (CAR, 50 μ M) que foram co-incubados com D-Ser e os homogeneizados cerebrais. As doses utilizadas desses antioxidantes foram aquelas demonstradas efetivas para uma ação antioxidante.

3.3.2 Parâmetros de Estresse Oxidativo

3.3.2.1 Avaliação da Peroxidação Lipídica

3.3.2.1.1 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS)

A medida dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) foi realizada de acordo com o método de Esterbauer & Cheeseman (1990). 300 μ L de ácido tricloroacético 10 % foram adicionados à alíquota retirada da incubação previamente realizada. Após centrifugação, 300 μ L do sobrenadante foram tratados com ácido tiobarbitúrico 0,67 % na proporção de 1:1. A mistura foi levada a um banho fervente durante 25 min e, após, resfriada em água a temperatura ambiente. A absorvância obtida através da coloração rósea resultante foi medida em espectrofotômetro a 532 nm. Concomitantemente, foi feita uma curva de calibração com 1, 1, 3, 3 – tetrametoxipropano, na qual todos os pontos foram tratados da mesma forma que as amostras. Os resultados foram calculados como nmol TBA-RS/mg de proteína e expressos como percentagem do controle.

3.3.2.1.2 Quimiluminescência

A medida da quimiluminescência foi realizada através do método de González-Flecha *et al.* (1991). Aos tubos foram adicionados 3,5 mL de tampão contendo fosfato de sódio 20 mM e cloreto de potássio 140 mM, pH 7,4, e a luminescência basal foi medida em contador de cintilação líquida durante 5 min.

Após essa leitura, uma alíquota de 500 μL das amostras incubadas foi imediatamente adicionada e a quimiluminescência foi medida durante 30 min a temperatura ambiente. Todo o procedimento foi realizado em sala escura e à temperatura ambiente. Os tubos utilizados para esta técnica foram lavados separadamente de outros materiais do laboratório com solução detergente, exaustivamente lavados com água destilada, fervidos por 10 minutos e mantidos no escuro 12 horas antes do experimento. O valor total foi diminuído do valor basal e os resultados foram calculados como cpm/mg proteína e expressos como porcentagem do controle.

3.3.2.2 Medida da Oxidação de Proteínas

3.3.2.2.1 Medida de Grupamentos Sulfidril

A medida de grupos sulfidril, em homogeneizado de córtex cerebral, foi feita utilizando um ensaio baseado na redução de tiois a partir do ácido 5,5'-ácido ditio-bis-nitrobenzóico (DTNB), gerando um produto final amarelo medido espectrofotometricamente a 412 nm (KOWALTOWSKI *et al.*, 1997).

Uma alíquota de 160 μL do sobrenadante foi incubada a 37°C por 30 minutos com D-serina. Após a incubação, 1 mL de DTNB 0,1 mM preparado em solução fosfato de potássio 0,2 M, pH 8,0, foi adicionado, e os tubos foram mantidos no escuro a temperatura ambiente por 30 minutos. A absorvância foi medida a 412 nm, o resultado foi calculado como nmol/mg de proteína e expressos como porcentagem do controle.

3.3.2.2.2 Formação de Carbonilas

A formação de carbonilas, um marcador de oxidação a proteínas, foi medida em espectrofotômetro de acordo com Reznick & Packer (1994). Uma alíquota de 100 μL da incubação foi tratada com 400 μL de 10 mM 2,4-(DNFH) dissolvida em 2,5 N HCL e para o branco 2,5 N HCl, e colocada no escuro por uma hora. A amostra foi precipitada com 500 μL de TCA 20% e centrifugada por 5 minutos a 10.000 x g. O sedimento foi lavado com etanol: acetato de etila (1:1, V/V) e dissolvido em 550 μL de guanidina 6 M preparada em HCl, e incubado a

37°C. A diferença entre as amostras tratadas com DNFH e tratadas com HCL (branco) foi usada para determinar o conteúdo de carbonilas a 365 nm. O conteúdo de carbonilas foi calculado em nmol/mg de proteína, e os resultados expressos em percentual do controle.

3.3.2.3 Avaliação das Defesas Antioxidantes Não-Enzimáticas

3.3.2.3.1 Medida das Concentrações de Glutathiona Reduzida (GSH)

As concentrações de glutathiona reduzida (GSH) foram medidas de acordo com a técnica de Browne & Armstrong (1998). As alíquotas provenientes da pré-incubação foram tratadas com ácido metafosfórico com o objetivo de precipitar as proteínas e proporcionar um meio com pH ácido para a glutathiona ser mantida na forma reduzida. Após centrifugação, foram adicionados 50 µL de *o*-ftaldialdeído a 100 µL do sobrenadante obtido. A fluorescência gerada foi medida com comprimentos de onda de excitação e emissão de 350 e 420 nm, respectivamente. A curva de calibração foi realizada com GSH padrão (0,01-1 mM), a concentração calculada em nmol GSH/mg proteína e expressa como percentagem do controle.

Em outros experimentos, com o objetivo de avaliar uma possível ação pró-oxidante da D-serina, este aminoácido foi incubado na presença de uma solução comercial de GSH (200 µM) em um meio de incubação contendo tampão fosfato de sódio 20 mM e cloreto de potássio 140 mM, pH 7,4. N-etilmaleimida (NEM; 150 µM), um oxidante clássico de grupamentos tióis, foi utilizado como controle positivo. Após 60 minutos, foi adicionado *o*-ftaldialdeído 7,4 mM e a mistura incubada durante 15 min a temperatura ambiente. A fluorescência gerada foi medida com comprimentos de onda de excitação e emissão de 350 e 420 nm, respectivamente. Os resultados foram expressos como unidades de fluorescência e expressos como percentagem do controle.

3.4 Estudos *ex vivo*

3.4.1 Procedimento Cirúrgico

3.4.1.1 Anestesia

Antes da cirurgia os animais foram anestesiados com a mistura equitesina, composta por hidrato de cloral (0,425 g), sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (0,216 g), solução de tiopental (25 mg/mL) (4 mL), propilenoglicol (4,28 mL), álcool etílico P.A. (1,15 mL) e água Milli Q (Q.S.P.) para completar um volume final de 10 mL. O anestésico equitesina foi administrado por via intraperitoneal (i.p.), respectivamente nas doses de 1 mL para cada 300 g de peso corporal.

3.4.1.2. Coordenadas do Estriado

As coordenadas para injeção intraestriatal (I.E.) de D-serina, medidas a partir do bregma, foram: AP: antero-posterior; LL: látero-lateral; DV: dorso-ventral, sempre com inclinação da cabeça de -0,33 cm, a partir de indicações do Atlas de Paxinos & Watson (1996).

Ventrículo lateral: AP= $\pm 0,6$ mm; LL= $\pm 2,6$ mm; DV= $\pm 4,5$ mm

A posição correta das coordenadas foi verificada através de cirurgias-piloto, com injeção de azul de metileno 4% dissolvido em solução salina.

3.4.1.3 Craniotomia e Injeção de D-serina

Cada animal operado foi cuidadosamente colocado em um aparelho estereotáxico (*David Kopf*, modelo 1404), sua cabeça imobilizada com barras inter-auriculares e a barra de pressão do incisivo (inclinação de -0,33 cm), sendo, então, a superfície de seu crânio exposta mediante incisão sagital com um bisturi com lâminas de número 20 ou 21.

Uma craniotomia bilateral foi realizada com o emprego de uma broca odontológica nos locais (sobre o crânio exposto) correspondentes às coordenadas antero-posteriores (AP) e látero-laterais (LL) da estrutura.

Foram injetados 2 μl do aminoácido D-serina (8 μmol) lentamente durante 3 minutos em ambos os estriados, utilizando-se uma agulha fina (calibre 30) conectada por um tubo de polietileno a uma seringa Hamilton de 10 μL . A agulha foi mantida no local por mais um minuto antes de ser suavemente removida, sendo o tempo cirúrgico de aproximadamente 4 minutos para cada hemisfério. O grupo controle recebeu injeção I.E. de solução salina de maneira semelhante.

3.4.1.4 Sacrifício dos Animais e Isolamento das Estruturas Estudadas

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais e sacrificados por decapitação 30 minutos ou 2 horas após o procedimento cirúrgico. O cérebro foi rapidamente retirado, o sangue removido e a estrutura estudada (estriado) foi rapidamente dissecada e encaminhada para a realização dos testes.

3.4.1.5 Preparação de Homogeneizados de Estriado Cerebral

Após a dissecação, as estruturas foram pesadas e homogeneizadas em tampão fosfato de sódio 20 mM, contendo cloreto de potássio 140 mM, pH 7,4, na proporção de 1:10 (peso/volume) e o homogeneizado obtido foi levado à centrifugação a 750 g durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi empregado para a medição dos diferentes parâmetros de estresse oxidativo.

3.4.2 Parâmetros de Estresse Oxidativo

3.4.2.1 Avaliação da Peroxidação Lipídica

A avaliação de dano oxidativo lipídico foi feita através da medida dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e foi realizada de acordo com o método de Yagi (1998). Foram adicionados a 100 μL de amostra 200 μL de ácido tricloroacético 10 % e 300 μL de ácido tiobarbitúrico 0,67%. A mistura foi levada a um banho fervente durante 2 h e, após, resfriada em água à temperatura ambiente. Foram adicionados 400 μL de butanol e os tubos foram agitados por

exatos 20 segundos e após centrifugados a 5.000 x *g* durante 3 minutos. Após a centrifugação foram retirados 300 µL da fase superior (fase orgânica), os quais foram lidos espectrofluorimetricamente em comprimentos de onda de excitação e emissão de 515 nm e 553 nm, respectivamente. Concomitantemente, foi feita uma curva de calibração com 1, 1, 3, 3 – tetrametoxipropano, na qual todos os pontos foram tratados da mesma forma que as amostras. Os resultados foram calculados como nmol TBA-RS/mg de proteína e expressos como percentagem do controle.

3.4.2.2 Avaliação das Defesas Antioxidantes Não-Enzimáticas

3.4.2.2.1 Medida das Concentrações de Glutathiona Reduzida (GSH)

A avaliação das defesas antioxidantes não-enzimáticas feita pela medida das concentrações de glutathiona reduzida (GSH) foi realizada de acordo com a técnica de Browne & Armstrong (1998), como descrito anteriormente no item 3.3.2.3.1.

3.4.2.2.2 Estado Antioxidante Total do Tecido (TAS)

O estado antioxidante total do tecido foi avaliado utilizando-se um kit (Calbiochem Total Antioxidant Status assay) com o qual se avalia a oxidação do ABTS (2,2'-Azino-di-[3-etilbenzo-tiazolina sulfonato]) a $ABTS^{\cdot+}$ por uma peroxidase. O conteúdo de $ABTS^{\cdot+}$ é monitorado espectrofotometricamente a 600nm. A quantidade de antioxidantes presente na amostra causa uma supressão dessa absorvância proporcionalmente a suas concentrações.

3.4.2.3 Medida das Atividades Antioxidantes Enzimáticas

3.4.2.3.1 Glutathiona Peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi determinada pelo método de Wendel (1981) usando hidroperóxido de tert-butila como substrato. Em uma cubeta de quartzo foram adicionados os seguintes reagentes: 600 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM, 10 µL de azida sódica 40 mM, 15 µL de glutathiona 100 mM, 15 µL glutathiona redutase 10 U/ml, 10 µL NADPH 10 mM e 10

μL de amostra (0,1 – 0,3 μg de proteína). Esta mistura foi incubada a 25 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 minuto, a fim de estabilizar o meio e após foram adicionados 50 μL de hidroperóxido de tert-butila 10 mM para iniciar a reação. Os brancos foram preparados substituindo a amostra por tampão fosfato. A queda da absorvância a 340 nm foi lida durante 240 segundos e a atividade da GPx calculada utilizando-se o coeficiente de extinção do NADPH a 340 nm de $6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A atividade da GPx foi calculada como U/mg de proteína (1U = 1 μmol NADPH consumido/min).

3.4.2.3.2 Catalase (CAT)

A atividade desta enzima foi determinada através do método de Aebi (1984). Em 100 μL do sobrenadante foram adicionados 10 μl de Triton 0,1 % seguido de agitação, esta mistura foi conservada em banho de gelo durante 15 minutos. Em 50 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM pH=7,0 foram adicionados 100 μl de H_2O_2 30% (v/v). Foram pipetados 600 μl deste meio em cubeta de quartzo, e o aparelho estabilizado contra um branco corrido separadamente de tampão fosfato. Após adição de 25 μl de amostra foi realizada a leitura da queda da absorvância do H_2O_2 em espectrofotômetro a 240 nm, em temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 2$), durante 100 segundos. Para o cálculo da CAT utilizou-se o coeficiente de extinção do H_2O_2 de $43.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados da atividade da CAT foram expressos em U/mg proteína (1U = 1 μmol H_2O_2 consumido/min).

3.4.2.3.3 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida através da utilização do Kit Randox. O método baseia-se na formação do vermelho de formazan através da reação do ânion superóxido (produzido no meio a partir de um sistema xantina-xantina oxidase) e do cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio gerando um complexo rosa que é lido a 505 nm. A inibição de formação do cromôgeno foi proporcional à atividade da SOD.

3.5 Medida de Proteínas

O conteúdo protéico em todas as técnicas empregadas foi determinado pelo método de Lowry *et al.* (1951), usando albumina bovina sérica como padrão.

3.6 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e a média usada para os cálculos. A significância estatística foi determinada pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Duncan, quando o F foi significativo. O teste de regressão linear foi também utilizado para se verificar efeitos dose-resposta. A comparação entre duas médias foi feita pelo teste *t* de Student para amostras independentes. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo. Toda a análise estatística foi feita através do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) em um computador PC compatível.

4. RESULTADOS

4.1 Estudos *in vitro*

Inicialmente estudamos o efeito *in vitro* da D-serina sobre vários parâmetros de estresse oxidativo. Começamos pelos parâmetros de peroxidação lipídica verificados pela determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

4.1.1 Efeito *in vitro* da D-serina sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens

A figura 4.1 mostra que a D-serina aumentou significativamente os níveis de TBA-RS [$F_{(4,20)}=21,28$; $P < 0,001$] em concentrações tão baixas como 0,1 mM, de forma dose-dependente [$\beta=0,848$; $P < 0,001$] em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

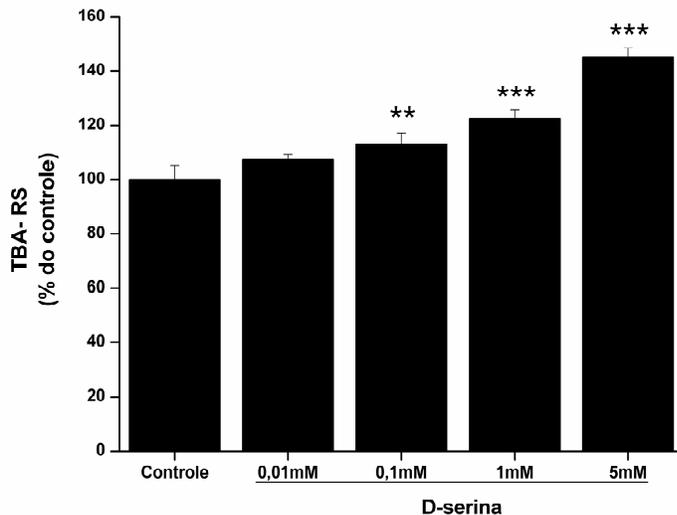


Figura 4.1 – Efeito *in vitro* da D-serina sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens. Os valores representam média \pm erro padrão da média (n=5) e foram expressos em percentual dos controles ($3,42 \pm 0,40$ mmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de raios múltiplos de Duncan (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, comparado ao controle).

4.1.2 Efeito de antioxidantes sobre a peroxidação lipídica (TBA-RS) induzida por D-serina em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens *in vitro*

Avaliamos também a influência de alguns antioxidantes sobre o aumento produzido pela D-serina nos níveis de ácido tiobarbitúrico (TBA-RS). Para isso, o homogeneizado de córtex cerebral foi incubado com D-serina (5 mM) na presença de creatina (CRE, 3 mM), N-acetilcisteína (NAC, 1 mM), glutatona reduzida (GSH, 750 μ M), melatonina (MEL, 750 μ M), trolox (TRO, α -tocoferol, 5 μ M), a combinação de superóxido dismutase (SOD) mais catalase (CAT) (15 mU/mL cada), ou L-carnitina (CAR, 50 μ M). As doses utilizadas desses antioxidantes foram aquelas demonstradas efetivas para uma ação antioxidante. A figura 4.2 mostra que, nestas concentrações, NAC, GSH, MEL e TRO, mas não CRE, SOD

mais CAT e CAR, preveniram o dano oxidativo lipídico causado por D-serina [$F_{(8,36)}=12,919$; $P < 0,001$].

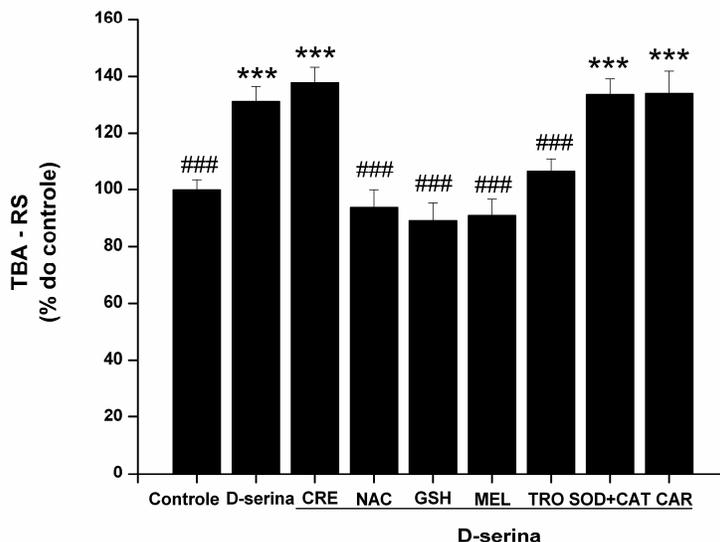


Figura 4.2 – Efeito *in vitro* dos antioxidantes creatina (CRE, 3 mM), N-acetilcisteína (NAC, 1 mM), GSH (750 μ M), melatonina (MEL, 750 μ M), trolox (TRO, α -tocoferol, 5 μ M), a combinação de superóxido dismutase (SOD) mais catalase (CAT) (15 mU/mL cada), ou L-carnitina (CAR, 50 μ M) sobre a peroxidação lipídica induzida por D-serina (5 mM) (TBA-RS) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens. Os valores representam média \pm erro padrão da média (n=5) e foram expressos em percentual dos controles (3,21 \pm 0,25 nmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de raios múltiplos de Duncan [*** $P < 0,001$, comparados com controles; ### $P < 0,001$ comparados com D-serina (5 mM)].

4.1.3. Efeito *in vitro* da D-serina sobre a quimiluminescência induzida por íon ferroso (Fe^{2+}) e ácido ascórbico (ASC) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens

Os resultados demonstram que a D-serina também aumentou significativamente a quimiluminescência induzida por Fe^{2+} e ASC em

homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens [$F_{(4,20)}=3,735$; $P < 0,05$] de forma dose dependente [$\beta=0,553$; $P < 0,01$] (Figura 4.3).

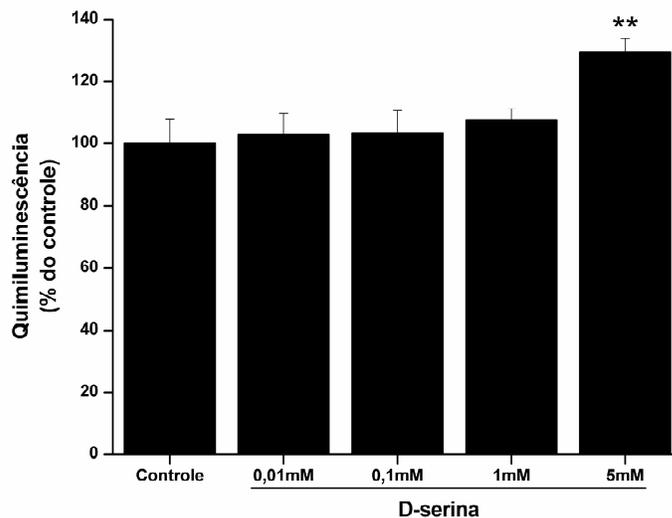


Figura 4.3 – Efeito *in vitro* da D-serina sobre a quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens. Os valores representam média \pm erro padrão da média ($n=5$) e foram expressos em percentual dos controles (2552 ± 453 cpm/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de raios múltiplos de Duncan (** $P < 0,01$, comparado ao controle).

Estudamos então o efeito *in vitro* da D-serina sobre a oxidação de proteínas, medida através da determinação do conteúdo dos grupamentos sulfidril e da formação de carbonilas em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

4.1.4 Efeito *in vitro* da D-serina sobre o conteúdo de grupamentos sulfidríla em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens

A figura 4.4 mostra que a D-serina, na concentração de 5 mM, diminuiu significativamente a medida de grupamentos sulfidríla em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens [$F_{(3,16)}=3,995$; $P < 0,05$].

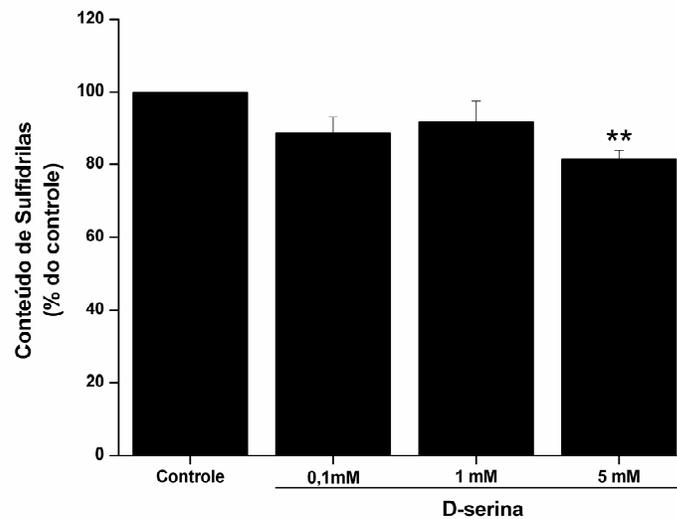


Figura 4.4 – Efeito *in vitro* da D-serina sobre a medida de grupos sulfidríla em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens. Os valores representam média \pm erro padrão da média ($n=5$) e foram expressos em percentual dos controles ($43,9 \pm 5,4$ nmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de raios múltiplos de Duncan (* $P < 0,05$, comparado ao controle).

4.1.5 Efeito *in vitro* da D-serina sobre a formação de carbonilas em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens

Na figura 4.5 demonstramos que a D-serina, na concentração de 5 mM, aumentou significativamente a formação de carbonilas em homogeneizado de córtex cerebral [$F_{(2,12)}=4,326$, $P < 0,05$].

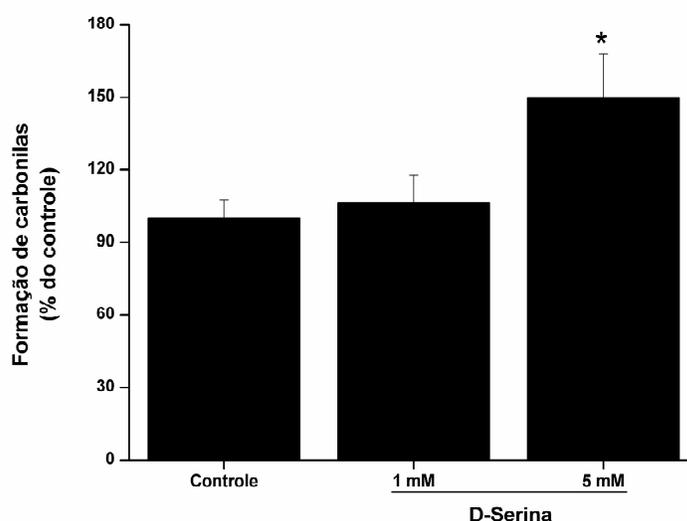


Figura 4.5 - Efeito *in vitro* da D-serina sobre a formação de carbonilas em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens. Os valores representam média \pm erro padrão da média ($n=5$) e os resultados expressos em percentual dos controles ($1,08 \pm 0,24$ nmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de raios múltiplos de Duncan (* $P < 0,05$, comparado ao controle).

O próximo passo de nossa investigação foi estudar o efeito *in vitro* da D-serina sobre as defesas antioxidantes não enzimáticas, medida através da glutathiona reduzida (GSH) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

4.1.6 Efeito *in vitro* da D-serina sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens

A figura 4.6 demonstra que a D-serina diminuiu significativamente os níveis de GSH [$F_{(4,20)}=7,486$; $P < 0,001$] em homogeneizado de córtex cerebral de forma dose-dependente [$\beta=0,743$; $P < 0,001$].

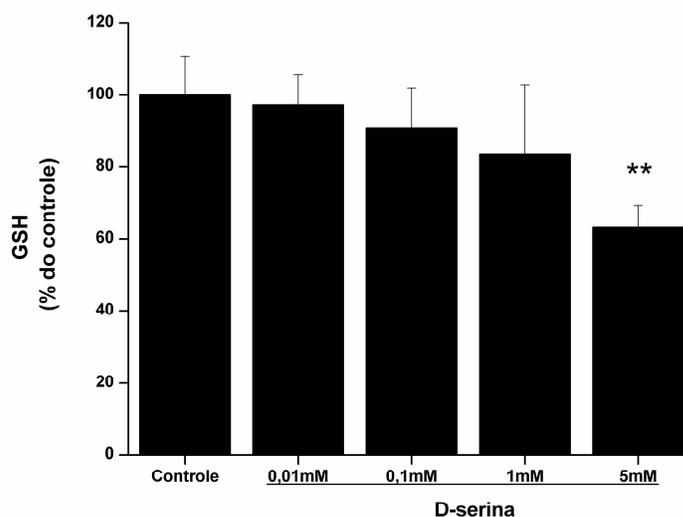


Figura 4.6 – Efeito da D-serina sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens. Os valores representam média \pm erro padrão da média ($n=5$) e foram expressos em percentual dos controles ($4,72 \pm 0,50$ nmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de raios múltiplos de Duncan (** $P < 0,01$, comparado ao controle).

Testamos então se os antioxidantes CRE (3 mM), MEL (750 μ M), TRO (5 μ M), a combinação SOD mais CAT (15 mU/mL cada), ou CAR (50 μ M) poderiam prevenir a diminuição dos níveis de GSH provocada por D-serina em homogeneizado de córtex cerebral.

4.1.7 Efeito de antioxidantes sobre a redução dos níveis de glutatona (GSH) induzida por D-serina em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens *in vitro*

A figura 4.7 mostra que a MEL preveniu totalmente a diminuição dos níveis de GSH em homogeneizado de córtex cerebral, enquanto que o TRO atenuou a diminuição dos níveis de GSH causada por D-serina. Já a CRE, a combinação de SOD com CAT e a CAR não interferiram sobre a diminuição das concentrações de GSH causada pela D-serina [$F_{(6,28)}=5,990$; $P < 0,001$].

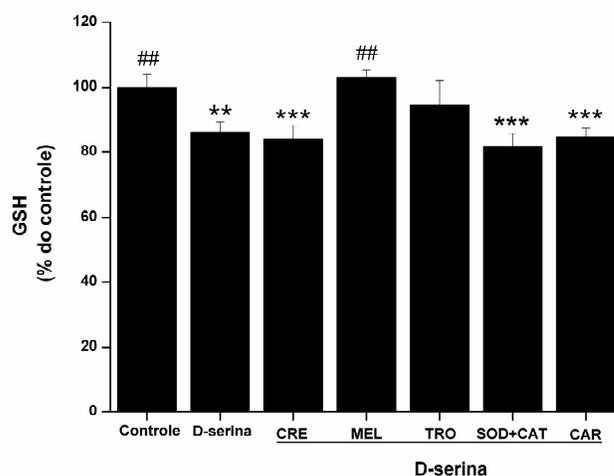


Figura 4.7 – Efeito dos antioxidantes creatina (CRE, 3 mM), melatonina (MEL, 750 μ M), trolox (TRO, α -tocopherol, 5 μ M), a combinação de superóxido dismutase (SOD) com catalase (CAT) (15 mU/mL cada), e L-carnitina (CAR, 50 μ M) sobre a redução dos níveis de glutatona (GSH) induzida *in vitro* por D-serina (5 mM) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens. Os valores representam média \pm erro padrão da média ($n=5$) e foram expressos em percentual dos controles ($7,57 \pm 0,68$ nmol/mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de raios múltiplos de Duncan [*** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, comparados com os controles; ## $P < 0,01$ comparados com D-serina (5 mM)].

4.1.8 Efeito *in vitro* da D-serina sobre a oxidação de uma solução comercial de glutationa reduzida (GSH)

A figura 4.8 mostra que a D-serina, na concentração de 5 mM, reduziu acentuadamente os níveis de uma solução comercial de GSH (200 μ M) (50%), similarmente ao efeito que é provocado por 150 μ M de N-etilmaleimida (NEM), um oxidante clássico de grupos sulfidríla [$F(2,6)=16,572$; $P < 0,01$]. Estes dados indicam que D-serina por si mesma é um oxidante direto de grupos tióis.

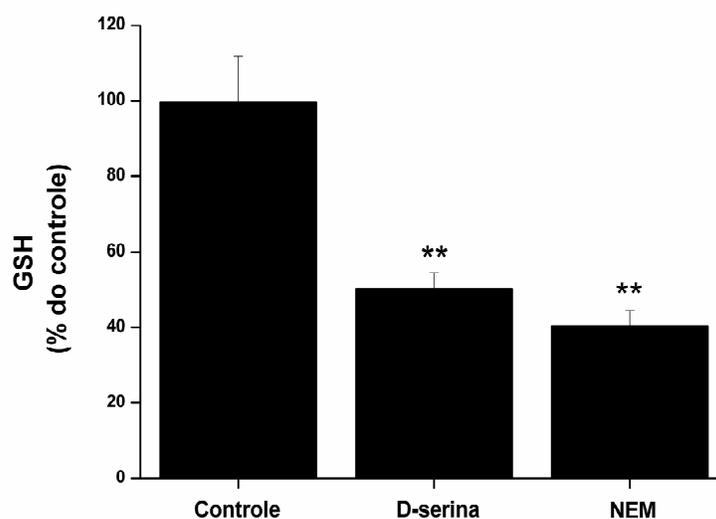


Figura 4.8 – Efeito *in vitro* da D-serina (5 mM) sobre a oxidação de uma preparação purificada comercial de 200 μ M glutationa reduzida (GSH). N-etilmaleimida (NEM, 150 μ M) representou o controle positivo. Os valores representam média \pm erro padrão da média ($n=6$) e foram expressos em percentual dos controles (1471 ± 309 unidades de fluorescência). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguindo-se do teste de raios múltiplos de Duncan (** $P < 0,01$, comparado ao controle).

4.2 Estudos *ex vivo*

O presente estudo também teve por objetivo verificar o efeito da administração intraestriatal de D-serina (8 μmol) sobre parâmetros de estresse oxidativo em estriado de ratos jovens.

4.2.1. Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em estriado de ratos jovens 30 minutos após a injeção

Inicialmente, estudamos o efeito da administração I.E. da D-serina (8 μmol) sobre a medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) nesta estrutura cerebral 30 minutos após a injeção. A figura 4.9 mostra que a injeção I.E. de D-serina aumentou significativamente os níveis de TBA-RS no estriado (27%), relativamente aos controles injetados com solução salina [$t_{(8)}=2,72$; $P < 0,05$].

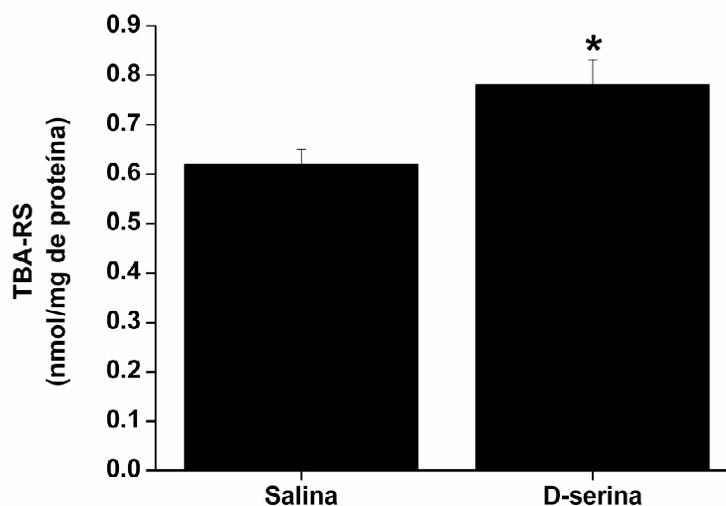


Figura 4.9 – Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre os níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em estriado de cérebro de ratos jovens 30 minutos após a injeção. Os valores representam média \pm erro padrão da média ($n=5$). * $P < 0,05$, teste t de Student para amostras independentes.

4.2.2 - Efeitos da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre o conteúdo de grupos sulfidríla em estriado de ratos jovens 30 minutos após a injeção

Podemos observar na figura 4.10 que a administração I.E. de D-serina (8 μmol) não alterou significativamente o conteúdo de grupamentos sulfidríla 30 minutos após a sua administração no estriado de ratos jovens [$t_{(8)} = 1,65$; $P > 0,05$].

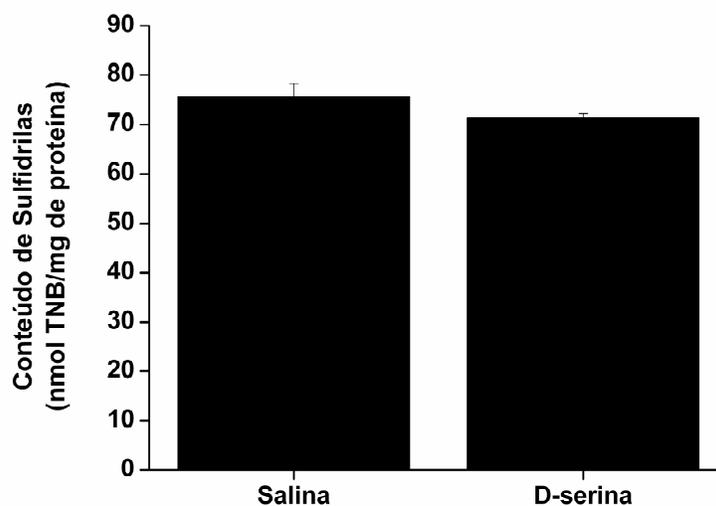


Figura 4.10 – Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a formação de grupamentos sulfidríla em estriado de cérebro de ratos jovens 30 minutos após a injeção. Os valores representam média \pm erro padrão da média ($n = 5$). Os resultados foram analisados por teste t de Student para amostras independentes. Não houve diferença significativa entre os grupos.

O próximo passo de nossa investigação foi estudar o efeito da injeção intraestriatal de D-serina (8 μmol) sobre as defesas antioxidantes não enzimáticas e enzimáticas do cérebro. Como parâmetro de defesas antiantioxidantes não-enzimáticas, utilizamos a determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), o

mais importante agente antioxidante do cérebro, e o estado antioxidante total do tecido (TAS). Como parâmetros de defesas antioxidantes enzimáticas medimos a atividade das enzimas glutatona peroxidase, catalase e superóxido dismutase.

4.2.3 - Efeitos da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre as concentrações de glutatona reduzida (GSH) em homogeneizado de estriado de ratos jovens 30 minutos após a injeção

Na figura 4.11 verificamos que a administração I.E. de D-serina (8 μ mol) diminuiu significativamente as concentrações de GSH em estriado de ratos jovens 30 minutos após sua administração [$t_{(8)} = 7,62$; $P < 0,001$].

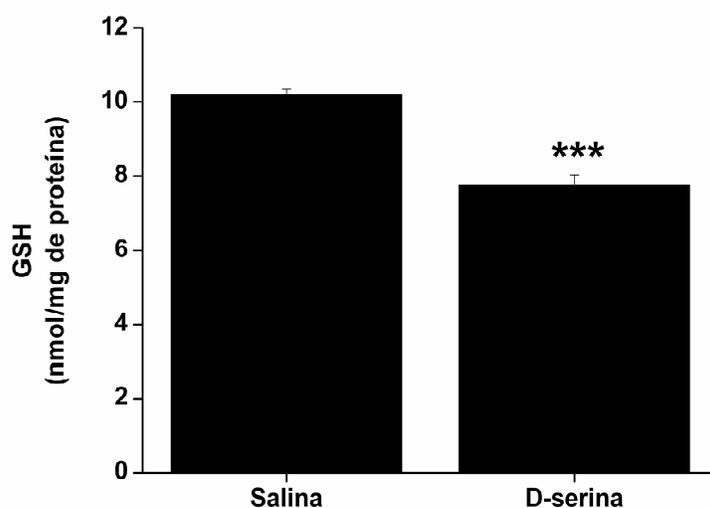


Figura 4.11 – Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre os níveis de glutatona reduzida (GSH) em homogeneizado de estriado de ratos jovens 30 minutos após a injeção. Os valores representam média \pm erro padrão da média ($n = 5$). *** $P < 0,001$, os resultados foram analisados por teste t de Student para amostras independentes.

4.2.4 - Efeitos da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre o estado antioxidante total do tecido (TAS) em homogeneizado de estriado de ratos jovens 30 minutos após a injeção

Na figura 4.12 verificamos que a administração I.E. de D-serina (8 μmol) diminuiu significativamente o estado antioxidante total do tecido em estriado de ratos jovens 30 minutos após sua administração [$t_{(8)}= 3,21$; $P < 0,05$].

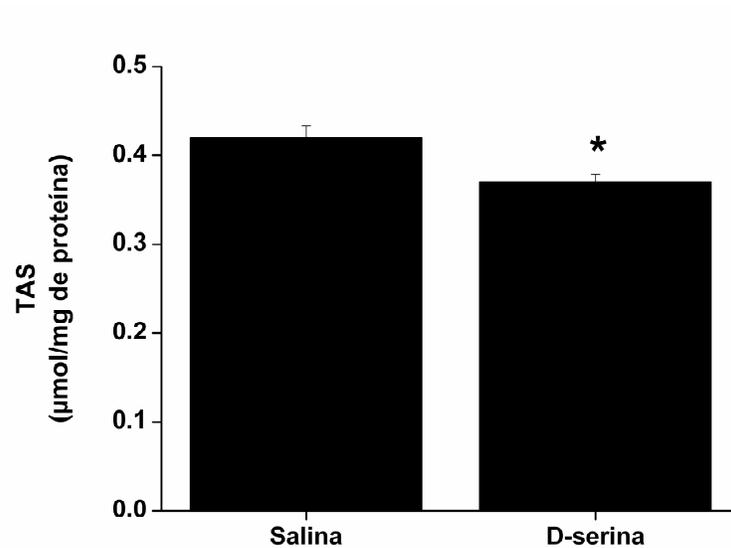


Figura 4.12 – Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre o estado antioxidante total do tecido (TAS) em homogeneizado de estriado de ratos jovens 30 minutos após a injeção. Os valores representam média \pm erro padrão da média ($n= 5$). * $P < 0,05$, os resultados foram analisados por teste t de Student para amostras independentes.

4.2.5 - Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a atividade da glutatona peroxidase (GPx) em estriado de cérebro de ratos jovens 30 minutos após a injeção

Podemos observar na figura 4.13 que a injeção I.E. de D-serina (8 μ mol) não aumentou significativamente a atividade da GPx no estriado de ratos jovens 30 minutos após sua administração [$t_{(8)}=0,45$; $P> 0,05$].

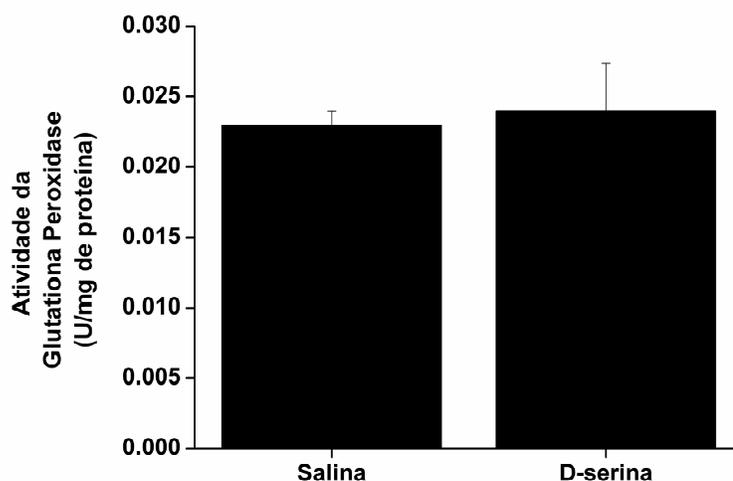


Figura 4.13 – Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a atividade da enzima antioxidante glutatona peroxidase (GPx) em homogeneizado de estriado de cérebro de ratos jovens 30 minutos após a injeção. Os valores representam média \pm erro padrão da média (n=5). Os resultados foram analisados por teste *t* de Student para amostras independentes. Não houve diferença significativa entre os grupos.

4.2.6 - Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a atividade da catalase (CAT) em estriado de cérebro de ratos jovens 30 minutos após a injeção

Na figura 4.14 observa-se que a D-serina (8 μ mol) não alterou a atividade da CAT em estriado de ratos jovens 30 minutos após a sua administração [$t_{(8)}=1,31$; $P> 0,05$].

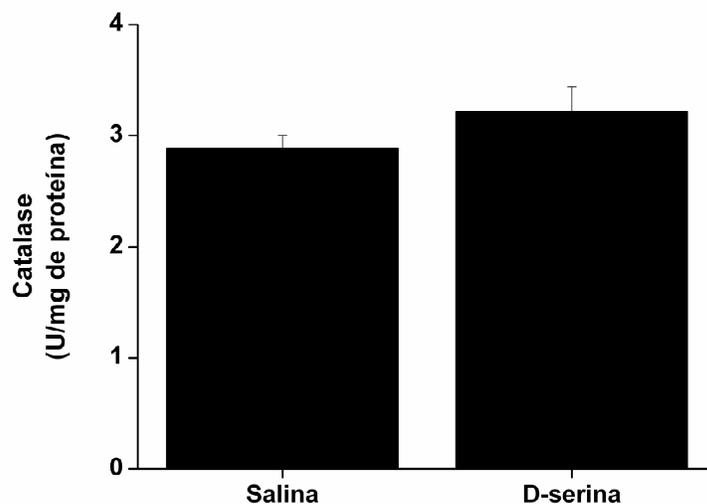


Figura 4.14 – Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) em homogeneizado de estriado de cérebro de ratos jovens 30 minutos após a injeção. Os valores representam média \pm erro padrão da média (n=5). Os resultados foram analisados por teste t de Student para amostras independentes. Não houve diferença significativa entre os grupos.

4.2.7 - Efeitos da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) em estriado de cérebro de ratos jovens 30 minutos após a injeção

A figura 4.15 mostra que a injeção I.E. de D-serina (8 μ mol) diminuiu a atividade da SOD em estriado de ratos jovens 30 minutos após a sua administração [$t_{(8)}=3,22$; $P < 0,05$].

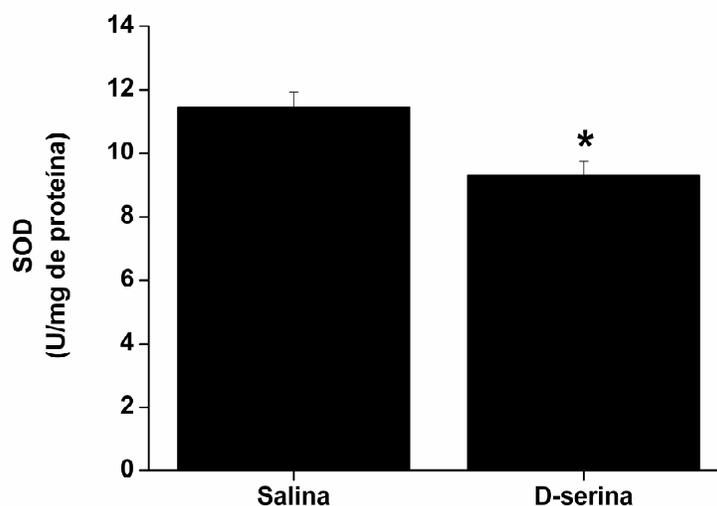


Figura 4.15 – Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) em homogeneizado de estriado de cérebro de ratos jovens 30 minutos após a injeção. Os valores representam média \pm erro padrão da média (n=5). * $P < 0,05$, os resultados foram analisados por teste t de Student para amostras independentes.

Como visto anteriormente, investigamos inicialmente os efeitos da administração intraestriatal de D-serina sobre parâmetros de estresse oxidativo nesta estrutura cerebral 30 minutos após a injeção. Estudamos também o efeito da administração intraestriatal de D-serina sobre estes mesmos parâmetros 2 horas após a sua administração.

4.2.8 - Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre a medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em estriado de ratos jovens 2 horas após a injeção

A figura 4.16 mostra que a injeção I.E. de D-serina (8 μ mol) não aumentou os níveis de TBA-RS no estriado de ratos jovens 2 horas após sua administração relativamente aos ratos injetados com solução salina [$t_{(8)}=0,96$; $P> 0,05$].

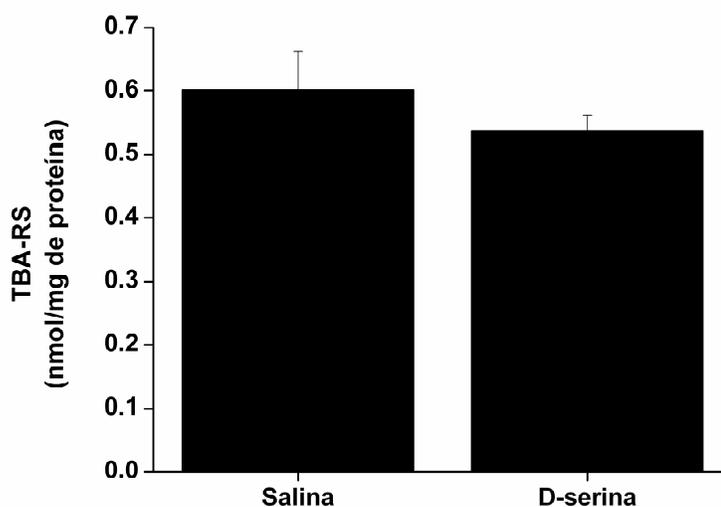


Figura 4.16 – Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de D-serina sobre os níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em estriado de cérebro de ratos jovens 2 horas após a injeção. Os valores representam média \pm erro padrão da média ($n=5$). Os resultados foram analisados por teste t de Student para amostras independentes. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)