

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

**VIVIANE SOARES SOUZA LIMA**

**EFEITOS DO ÁCIDO QUINURÊNICO NA AORTA APÓS  
ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM RATOS**

Bragança Paulista  
2020

**VIVIANE SOARES SOUZA LIMA – R.A. 00201909043**

**EFEITOS DO ÁCIDO QUINURÊNICO NA AORTA APÓS  
ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Mozer Sciani

Co-orientador: Prof. Dr. Mario Angelo Claudino

Bragança Paulista  
2020

WG 300  
L711e

Lima, Viviane Soares Souza  
Efeitos do ácido quinurênico após isquemia e  
reperfusão em aorta de ratos / Viviane Soares Souza  
Lima. – Bragança Paulista, 2021.  
45 p.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-  
Graduação *Stricto Sensu* em Ciência da Saúde da  
Universidade São Francisco.

Orientação de: Juliana Mozer Sciani.  
Co-orientação de: Mário Ângelo Claudino.

1. Ácido quinurênico. 2. Isquemia. 3. Reperfusão.  
4. Aorta. 5. Modelos. 6. Animais. I. Sciani, Juliana Mozer.  
II. Claudino, Mário Ângelo. III. Título.



Educando  
para a paz

**LIMA, Viviane Soares Souza.** "Efeitos do ácido quinurênico na aorta após isquemia e reperfusão em ratos". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 18 de fevereiro de 2021 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Mario Angelo Claudino - Coorientador e Presidente  
Universidade São Francisco

Prof. Dr. Adriano Augusto Meirelles Truffa  
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez  
Universidade São Francisco

Prof. Dr. Fernando Augusto de Lima Marson  
Universidade São Francisco

## **DEDICATÓRIA**

A minha família, em especial aos meus pais Vera e Jacintho que dedicaram a vida em prol da felicidade de seus filhos, e fizeram com que nos tornássemos as pessoas que somos hoje. Meus pais nos mostraram o que é honestidade e integridade, fizeram com que fossemos unidos e amigos. Hoje meu pai não se encontra fisicamente conosco, mas estará sempre em nossos corações. Se consegui tudo o que tenho hoje, não tem como não lembrar deles.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus verdadeiros amigos e familiares que me perdoaram pelas ausências em reuniões, festas e encontros por causa dos meus estudos.

Em especial ao Prof. Carlos Augusto Real Martinez que me incentivou a começar o mestrado e sempre esteve presente na minha formação. Ele tinha e ainda tem um carinho especial pelo meu pai, e esse carinho se estendeu a mim e a meu irmão.

## RESUMO

O ácido quinurênico, conhecido como KYNA, é formado pela via quinurênica. Derivado do triptofano, o KYNA vem sendo estudado como um marcador de doenças neurológicas, sendo pouco encontrado no sistema vascular. O aumento de sua concentração antes do infarto agudo do miocárdio, em pacientes com doenças cardiovasculares que tiveram angina. Também foi encontrado em processos isquêmicos, como doenças cardiovasculares e neurovasculares, e está sendo estudado para prever a instalação dessas enfermidades e consequentemente óbito. Assim, acredita-se que a presença dessa molécula possa auxiliar na identificação de pacientes que poderão ter um infarto ou até morrer, tentando assim identificá-los antes que o processo patológico se instale. No entanto, pouco se sabe do efeito tratamento da molécula, ou seja, se é capaz de reverter o dano causado pela doença cardiovascular como a isquemia, doença caracterizada pela lesão na parede dos vasos e abrupta obstrução do fluxo sanguíneo que irrigará os órgãos. O KYNA está presente no organismo de vários animais e foi identificado como angiogênico na pele de um anfíbio, em trabalho anterior do grupo, o que confirma a sua ação em vasos sanguíneos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do ácido quinurênico na recuperação da função da aorta após isquemia e reperfusão em modelo animal, e esclarecer mecanismos moleculares por técnicas de proteômica e metabolômica. Ratos machos da linhagem *Sprague Dawley* foram submetidos a laparotomia ventral abdominal para exposição da artéria aorta e veia cava, e distribuídos igualmente em três grupos experimentais: Sham (sem indução de isquemia), I/R (com indução de isquemia por clampeamento da aorta seguido por reperfusão), e I/R+KYNA, (indução de isquemia e tratamento *ex vivo* com KYNA). Posteriormente, a aorta foi removida e avaliada quanto à funcionalidade e mecanismos moleculares. Para a funcionabilidade, foi verificada a resposta da aorta com e sem isquemia, tratada ou não com KYNA frente a estímulos de noradrenalina (NA), acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (SNP). Os anéis aórticos foram examinados quanto a liberação de metabólitos, além do aumento na expressão de proteínas relacionadas à isquemia. A avaliação funcional do modelo de isquemia/reperfusão (I/R) mostrou aumento da resposta contrátil após isquemia com concentrações mais elevadas de noradrenalina. Em relação a acetilcolina e o nitroprussiato de sódio foi observado menor relaxamento da aorta após I/R. A incubação *ex vivo* com KYNA reduziu a resposta contrátil da aorta causada pela NA, e também proporcionou relaxamento similar ao do grupo Sham. Por estudos metabolômicos e proteômicos foi possível identificar moléculas que atuam na diminuição do estresse oxidativo, em transporte de oxigênio, homeostase de cálcio, liberação de neurotransmissores e inibição de atividade proteolítica. Assim, o KYNA está contribuindo para a reversão da lesão causada pela isquemia e reperfusão, além de estar modulando a neurotransmissão. Esses resultados suportam a hipótese de que o KYNA tem potencial para ser utilizado após uma condição isquêmica no sentido de recuperar a funcionalidade da aorta.

**Palavras-chave:** Ácido Quinurênico. Isquemia. Reperfusão. Aorta. Modelos Animais.

## ABSTRACT

Kynurenic acid, known as KYNA, is formed by the kynurenic pathway. Derived from tryptophan, KYNA is being studied as a marker of neurological diseases, being little studied in the vascular system. Some studies show an increase in its concentration before acute myocardial infarction, in patients with cardiovascular diseases who had angina. It has also been found in ischemic processes, such as cardiovascular and neurovascular diseases, and is being studied to predict the onset of these diseases and consequently death. Thus, it is believed that the presence of this molecule may help in the identification of patients who may have a heart attack or even die, thus trying to identify them before the pathological process is installed. However, little is known about the treatment effect of the molecule, that is, whether it is able to reverse the damage caused by cardiovascular disease such as ischemia, a disease characterized by damage to the vessel wall and abrupt obstruction of blood flow that will irrigate the organs. KYNA is present in the organism of several animals and has been identified as angiogenic in the skin of an amphibian, in a previous study by the group, which confirms its action in blood vessels. The aim of this study was to evaluate the effects of kynurenic acid on the recovery of aortic function after ischemia and reperfusion in an animal model, and to clarify molecular mechanisms by proteomics and metabolomics techniques. Male Sprague Dawley rats were submitted to abdominal ventral laparotomy to expose the aorta and vena cava, and equally distributed in three experimental groups: Sham (without ischemia induction), I/R (with ischemia induction by clamping the aorta followed by reperfusion), and I/R + KYNA, (ischemia induction and ex vivo treatment with KYNA). Subsequently, the aorta was removed and evaluated for functionality and molecular mechanisms. For functionality, the response of the aorta with and without ischemia, whether or not treated with KYNA, against norepinephrine (NA), acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (SNP) stimuli was verified. Aortic rings were examined for metabolite release, in addition to increased expression of ischemia-related proteins. The functional assessment of the ischemia / reperfusion (I/R) model showed an increase in the contractile response after ischemia with higher concentrations of norepinephrine. Regarding acetylcholine and sodium nitroprusside, less relaxation of the aorta was observed after I / R. Ex vivo incubation with KYNA reduced the contractile response of the aorta caused by NA, and also provided relaxation similar to that of the Sham group. Through metabolomic and proteomic studies it was possible to identify molecules that act in the reduction of oxidative stress, in oxygen transport, calcium homeostasis, release of neurotransmitters and inhibition of proteolytic activity. Thus, KYNA is contributing to the reversal of the injury caused by ischemia and reperfusion, in addition to modulating neurotransmission. These results support the hypothesis that KYNA has the potential to be used after an ischemic condition in order to recover the functionality of the aorta.

**Key Words:** Kynurenic Acid. Ischemia. Reperfusion. Aorta. Models, Animal.

## LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACh	Acetilcolina
ATP	Adenosina Trifosfato
BHE	Barreira Hematoencefálica
CEMIB	Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica
EC50	<i>Effective Concentration</i>
EDHF	<i>Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor</i>
EDRF	<i>Endothelium-Derived Relaxing Factor</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
eNOS	<i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
g	grama
GMP	<i>Guanosine Monophosphate</i>
h	hora
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
I/R	Isquemia/Reperfusão
KYNA	<i>Kynurenic acid</i> (Ácido quinurênico)
NA	Noradrenalina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	<i>Nitric Oxide</i> (Óxido Nítrico)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	<i>Platelet Activating Fator</i>
rpm	rotação por minuto
SNP	<i>Sodium Nitroprussiate</i> (Nitroprussiato de Sódio)
SOCESP	Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
µg/mL	micrograma por mililitro
µL	microlitro
°C	grau Celsius

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Esquema do sistema vascular e direção do fluxo sanguíneo em artéria/veia, arteríola/vênula e endotélio, mostrando também a sua composição. ....	12
<b>FIGURA 2.</b> Angiografia de aorta e artérias ilíacas.....	16
<b>FIGURA 3.</b> Metabolismo na isquemia e reperfusão. ....	19
<b>FIGURA 4.</b> Estrutura do ácido quinurênico. ....	19
<b>FIGURA 5.</b> Via de degradação do triptofano e formação de metabólitos, dentre eles o ácido quinurênico .....	21
<b>FIGURA 6.</b> Desenho da aorta e locais de interrupção de fluxo sanguíneo.....	27
<b>FIGURA 7.</b> Esquema experimental utilizado no trabalho.....	27
<b>FIGURA 8.</b> Contração da aorta induzida por noradrenalina (NA), em modelos de ratos normais e submetidos a isquemia. ....	33
<b>FIGURA 9.</b> Relaxamento da aorta induzida por acetilcolina (ACh), em modelos de ratos normais e submetidos a isquemia.. ....	39
<b>FIGURA 10.</b> Relaxamento da aorta induzida por nitroprussiato de sódio (NPS), em modelos de ratos normais e submetidos a isquemia.. ....	35
<b>FIGURA 11.</b> Contração da aorta induzida por noradrenalina (NA), em condições de isquemia e tratamento com KYNA. ....	36
<b>FIGURA 12.</b> Relaxamento da aorta induzida por acetilcolina (ACh), em condições de isquemia e tratamento com KYNA.....	37
<b>FIGURA 13.</b> Relaxamento da aorta induzida por nitroprussiato de sódio (NPS), em condições de isquemia e tratamento com KYNA.....	37
<b>FIGURA 14.</b> Funções biológicas das proteínas encontradas na aorta de ratos. ....	44

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Identificação de compostos no plasma tratado com 0,1 ou 1 mM de KYNA, significativamente diferentes do grupo controle (sem tratamento) .....	38
<b>TABELA 2.</b> Identificação de compostos na aorta, diferentes do grupo controle (sem tratamento) e tratado com 0,1 ou 1 mM de KYNA .....	39
<b>TABELA 3.</b> Identificação de proteínas na aorta, diferentes do grupo controle (sem tratamento) e tratado com 0,1 ou 1 mM de KYNA .....	40

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
1.1.	Sistema vascular .....	12
1.2.	Doenças cardiovasculares.....	15
1.2.1.	Isquemia .....	16
1.3.	Ácido quinurênico (KYNA).....	19
1.4.	Isquemia e KYNA .....	22
1.5.	Justificativa.....	23
2.	OBJETIVOS.....	25
2.1.	Geral .....	25
2.2.	Específicos.....	25
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1.	Animais.....	26
3.2.	Isquemia/reperfusão – estudo <i>ex vivo</i> .....	26
3.3.	Proteômica.....	28
3.4.	Metabolômica .....	29
3.5.	Isquemia/reperfusão – avaliação funcional .....	30
3.6.	Análise estatística .....	31
4.	RESULTADOS .....	33
4.1.	Padronização da isquemia/reperfusão - avaliação funcional.....	33
4.2.	Efeito do KYNA da isquemia/reperfusão - avaliação funcional .....	35
4.3.	Metabolômica .....	38
4.4.	Proteômica.....	39
5.	DISCUSSÃO.....	45
6.	CONCLUSÃO .....	51
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52

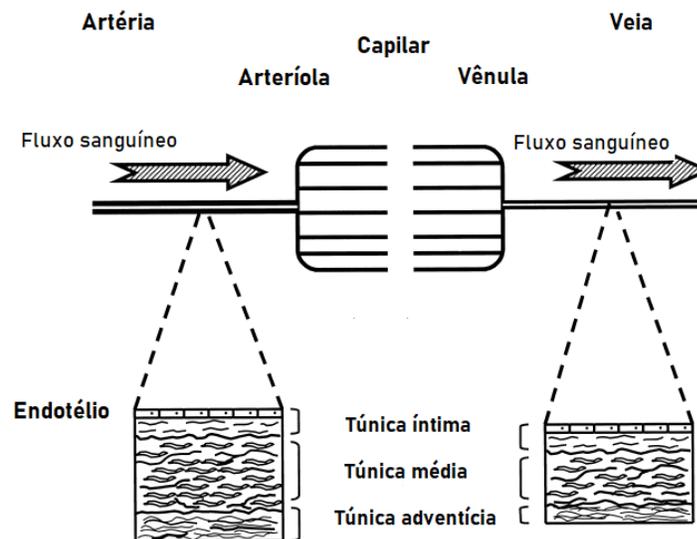
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Sistema vascular

O sistema circulatório consiste em uma bomba muscular, um coração e dois sistemas de vasos sanguíneos: a circulação pulmonar, que leva e traz sangue aos pulmões; e a circulação sistêmica, que distribui sangue aos tecidos, para a absorção de nutrientes e a remoção de produtos metabólicos e produtos celulares indesejáveis para a manutenção da homeostasia (SHEPHERD; VANHOUTTE, 1979).

Em ambas as circulações, o sangue sai do coração direto para as artérias, diminuindo seu calibre, até chegar a uma rede de capilares de parede delgada, e então retorna por meio das veias, que tem seu calibre aumentado até retornar ao coração, conforme mostrado na Figura 1 (MAFFEI et al., 2008).

Os vasos sanguíneos são compostos por três camadas: camada íntima de células endoteliais, média e adventícia ou túnica externa (PUGSLEY; TABRIZCHI, 2000).



**FIGURA 1.** Esquema do sistema vascular e direção do fluxo sanguíneo em artéria/veia, arteríola/vênula e endotélio, mostrando também a sua composição. Fonte: Figura adaptada de PUGSLEY e TABRIZCHI (2000).

As propriedades funcionais e biomecânicas das artérias musculares localizadas mais distalmente são consideravelmente diferentes das artérias elásticas. As musculares são mais rígidas, fenômeno relacionado à idade, apresentam maior conteúdo relativo de células musculares lisas e regulam o fluxo sanguíneo através de uma mudança ativa de diâmetro. Além disso, há diferença na expressão de proteínas, morfologia e rigidez intrínseca das artérias musculares e elásticas (LELOUP et al., 2019).

A túnica íntima possui células endoteliais que cobrem toda vasculatura, do coração até os menores capilares, formando a face interior dos vasos, funcionando como uma barreira entre o sangue e os outros tecidos. Também apresentam lâmina basal e um espaço subendotelial livre de células. Em grandes artérias de adultos contém, além das células endoteliais, células musculares lisas e ocasionalmente linfócitos e monócitos (TENNANT; MCGEACHIE, 1990).

O endotélio sintetiza importantes agentes de controle da homeostase e integridade da parede vascular, que promovem a formação de trombos e fatores trombolíticos, simultaneamente. Exemplos são o fator tissular, sintetizado após estímulos, o fator de Von Willebrand, que se liga a plaquetas e potencializa a trombogênese, e o fator ativador de plaquetas (*Platelet Activating Factor* - PAF) (RODGERS, 1988).

As células endoteliais ainda produzem substâncias vasoativas, que contribuem com o tônus vascular, como o óxido nítrico (*Nitric Oxide* - NO), as prostaciclina e os fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (*Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor* - EDHF). O NO está relacionado à liberação de neurotransmissores, como a acetilcolina (PRAST; PHILIPPU, 2001).

A acetilcolina é um agonista de receptores colinérgicos presentes na membrana da célula endotelial, e quando ativado aumenta as concentrações intracelulares de cálcio, que por sua vez se liga à calmodulina e leva à ativação do domínio de ligação à calmodulina de óxido nítrico sintase endotelial (*endothelial Nitric Oxide Synthase* - eNOS) para produzir NO, que por sua vez causa relaxamento do vaso. Desta forma, ocorre o relaxamento dos vasos pelas células musculares lisas, presentes na túnica

média, em um mecanismo de relaxamento dependente de endotélio (ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015).

A camada média, formada pelas células musculares, é responsável pela contração e relaxamento dos vasos. A contração pode iniciar por ativação mecânica ou farmacológica, aumentando a concentração de cálcio intracelular, assim como seu estoque no retículo sarcoplasmático, ou pelo influxo, abrindo os canais de cálcio da membrana celular (TENNANT; MCGEACHIE, 1990).

Assim como a acetilcolina, o nitroprussiato de sódio (SNP – sodium nitroprussiate) exerce relaxamento dos vasos sanguíneos por ser um doador de NO. O NO entra nas células endoteliais, ativa a enzima guanilato-ciclase solúveis no endotélio e causa aumento de GMP-cíclico (*Guanosine Monophosphate*), que afeta proteínas cinases G, fosfodiesterases, que causam relaxamento da musculatura do vaso sanguíneo (BENEDITO et al., 1991).

As artérias elásticas - mas não artérias musculares - produzem grandes quantidades de óxido nítrico basal e portanto a contribuição geral do NO ao tônus basal é maior (LELOUP et al., 2019).

A noradrenalina (NA) é um outro mediador químico vasoativo. No vaso sanguíneo se liga a receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos para promover contração. Quando ativados, os receptores ativam fosfolipase C e se inicia a produção de trifosfato de inositol e diacilglicerol como segundos mensageiros, que por sua vez aumentam a liberação intracelular de cálcio, que propicia a contração do músculo liso (SILVA; ZANESCO, 2010).

A túnica adventícia contém terminações nervosas, tecido adiposo perivascular e elementos conectivos que garantem aderência. Há também elementos envolvidos no desenvolvimento e remodelamento vascular. Mais externamente há colágeno e fibroblastos. Nessa camada ainda há o *Vasa vasorum*, que são os vasos dentro dos vasos para suprir a adventícia e parte da camada média. As veias o possuem em maior número devido ao sangue menos oxigenado (TENNANT; MCGEACHIE, 1990).

## 1.2 Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares são a maior causa de morbidade e de mortalidade no mundo (SOCESP, 2019). São um grupo de doenças do coração e dos vasos sanguíneos e incluem:

- Doença coronariana: doença dos vasos sanguíneos que irrigam o músculo cardíaco;
- Doença cerebrovascular: doença dos vasos sanguíneos que irrigam o cérebro;
- Doença arterial periférica: doença dos vasos sanguíneos que irrigam os membros inferiores e superiores;
- Doença cardíaca reumática: danos no músculo do coração e válvulas cardíacas devido a febre reumática, causada por bactérias estreptocócicas;
- Cardiopatia congênita: malformações na estrutura do coração pré existentes embrionária
- Trombose venosa profunda e embolia pulmonar (TASK FORCE MEMBERS et al., 2012).

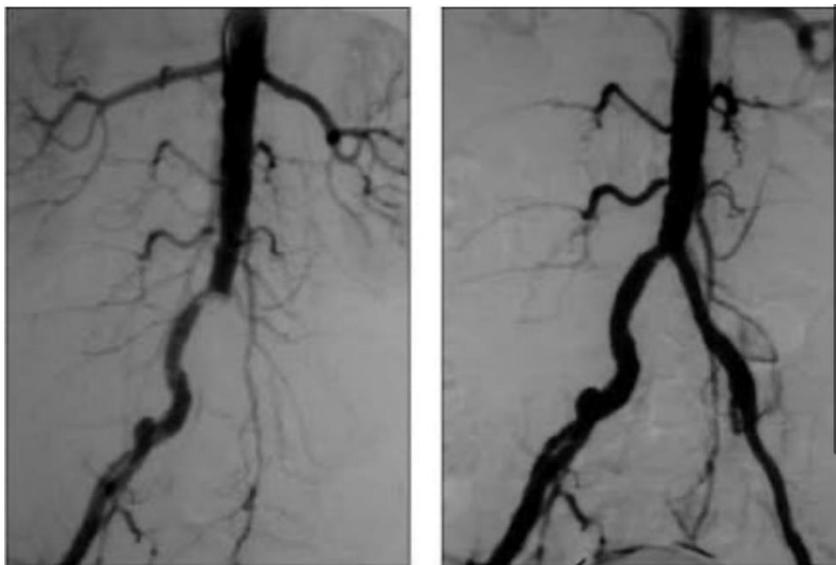
Os mais importantes fatores de risco para doenças cardiovasculares são hipertensão arterial, hiperglicemia, sobrepeso, dislipidemia e fatores comportamentais, sedentarismo, tabagismo, etilismo (MAFFEI et al., 2008).

Nas últimas décadas, o infarto agudo do miocárdio (IAM), mostrou ser um evento de incidência crescente, em especial em países desenvolvidos. Com o aumento da expectativa de vida, o número de atendimentos em emergência com suspeita de IAM é crescente. No Brasil, 100 mil pessoas morrem por IAM anualmente (DATASUS, 2014).

O infarto do miocárdio é definido histologicamente como morte celular (necrose) do músculo cardíaco como consequência de uma isquemia miocárdica. Essa isquemia pode se dar de diversas formas e o curso temporal pode ser prolongado pelo aumento do fluxo colateral, determinantes reduzidos do consumo de oxigênio no miocárdio e oclusão/reperusão intermitente, que podem pré-condicionar o coração. A implementação oportuna da terapia de reperusão quando apropriado, reduz a lesão isquêmica do miocárdio (THYGESEN et al., 2018).

A aterosclerose, outra doença cardiovascular muito incidente no mundo, é uma doença inflamatória crônica. Ela tem início no endotélio, com atração de macrófagos, monócitos, estes atravessam o endotélio acumulando lipídeos fagocitados. A doença aterosclerótica evolui de maneira lenta e progressiva e pode causar obstrução vascular, estenoses críticas, erosão, rotura de placa e embolia, determinando alta mortalidade (TENNANT; MCGEACHIE, 1990). A inflamação relacionada à aterosclerose é mediada por citocinas pró-inflamatórias, vias de sinalização inflamatória, lipídios bioativos e moléculas de adesão (ZHU et al., 2018).

A Figura 2A mostra a angiografia de uma aorta com obstrução, com oclusão da artéria ilíaca em sua origem, com conseqüente perda do fluxo sanguíneo nos vasos subsequentes. Na Figura 2B, a mesma aorta após tratamento com angioplastia a reperfusão, mostrando a regeneração do fluxo sanguíneo.



**FIGURA 2. Angiografia de aorta e artérias ilíacas. A esquerda, obstrução total do ramo ilíaco direito, e a direita após tratamento com angioplastia, método de escolha para tratamento. Fonte: PEDRON et al. (2001, pág. 263).**

### *1.2.1 Isquemia*

A isquemia é a diminuição ou interrupção da irrigação sanguínea em um determinado local, ocasionada por obstrução, vasoconstrição, entre outras. A síndrome

contribui com 60-70% da morbimortalidade relacionada com lesão renal e embolia arterial (YAMAKI et al., 2016).

É caracterizada pelo consumo e depleção de substrato de alta energia (ATP), privação de oxigênio aos tecidos e consequente conversão do metabolismo aeróbio para o anaeróbio. Quando seguida por reperfusão, ou seja, liberação do fluxo sanguíneo, há produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e sobrecarga de cálcio, e essas alterações de metabolismo celular podem gerar componentes tóxicos que agravam o quadro de injúria (MARCZIN et al., 2003).

Assim, embora a reperfusão sanguínea arterial imediata seja o melhor mecanismo para a eliminação do processo isquêmico, a reoxigenação celular está associada a aumento na peroxidação lipídica, dano celular e deteriorização da função (YAMAKI et al., 2016).

A obstrução leva à interrupção do fluxo sanguíneo para os tecidos periféricos, o que é conhecido como fenômeno de isquemia. Esta obstrução tem caráter progressivo, com formação de trombos na microcirculação, agregação plaquetária, edema celular e tecidual. A progressão deste fenômeno leva a irreversibilidade das lesões teciduais e morte do membro ou retalho (CUNHA et al., 2005).

A tolerância dos tecidos à isquemia varia com a natureza do tecido e diretamente com a presença ou ausência de circulação colateral. Em geral o músculo tolera isquemia acima de 4-6 horas, os nervos permanecem reversíveis até 8 horas, a gordura suporta até 13 horas, enquanto a pele e o osso suportam 1 há 4 dias, respectivamente, em condições de normotermia (MAFFEI et al., 2008).

Alguns tecidos, como o coração e o cérebro, extraem o máximo de oxigênio do sangue no repouso, assim qualquer aumento na demanda deve ser compensado pelo aumento de fluxo sanguíneo. Outros tecidos, como os rins e os músculos esqueléticos, não extraem o máximo de oxigênio no repouso, assim, qualquer aumento na demanda metabólica é compensado tanto pelo aumento da extração tissular de oxigênio como de fluxo sanguíneo (MAFFEI et al., 2008).

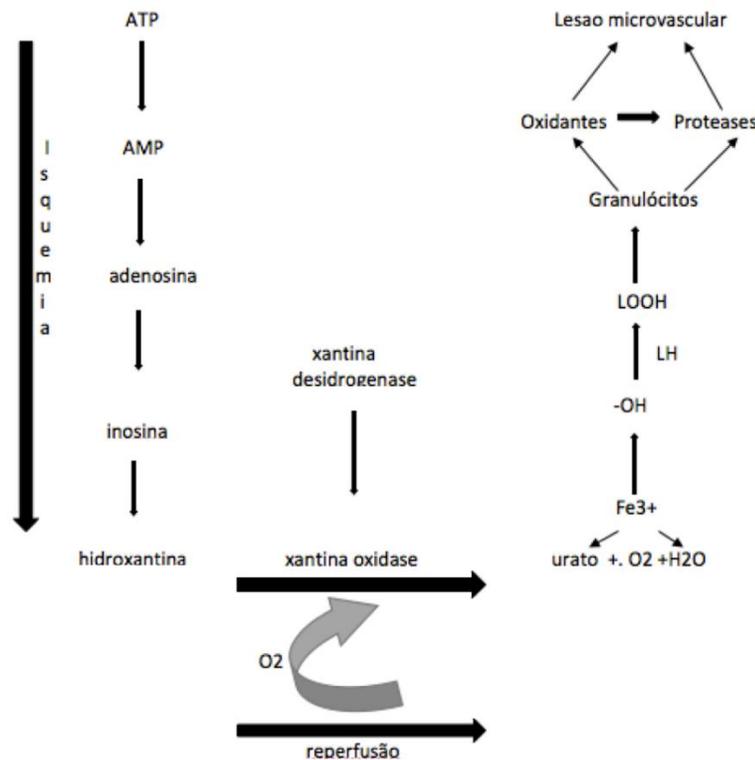
A demanda de oxigênio é função da atividade metabólica, assim uma potencial intervenção terapêutica é reduzir o metabolismo tissular. Por exemplo, os esforços no sentido de limitar a extensão do infarto do miocárdio concentram-se em reduzir a

demanda metabólica, diminuindo a sobrecarga cardíaca durante a fase crítica de recuperação (MAFFEI et al., 2008).

Durante a isquemia, há diminuição da tensão de oxigênio dentro da célula, o que determina interrupção da fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, cessa a produção de ATP pela mitocôndria. A fibra muscular tenta manter a atividade às custas do processo de anaerobiose, mas este é menos eficaz que o processo da respiração aeróbia (fosforilação oxidativa). O ATP também é gerado aerobicamente a partir do fosfato de creatinina, pela ação da enzima creatina cinase (MAFFEI et al., 2008).

Alguns autores consideram as mitocôndrias como pivôs na progressão da lesão reversível à lesão irreversível. Elas são responsáveis pela produção de ATP, transporte de elétrons e outras funções.

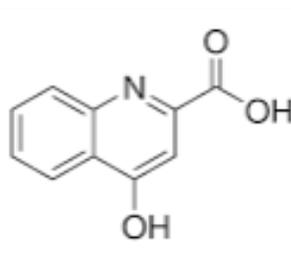
Assim, como mostrado na Figura 3, o quadro de isquemia leva a um consumo de ATP em inosina e posteriormente hidroxixantina, que por sua vez é degradada em urato durante a reperfusão, que juntamente com o íon ferro pode causar liberação de mensageiros que causam lesão microvascular. No retorno do fluxo de sangue após reperfusão há disfunção endotelial e infiltração de neutrófilos no local. Os neutrófilos reagem com moléculas de adesão (CD11/CD18) e com receptores na superfície do endotélio, causando inflamação, enquanto as espécies reativas de oxigênio reagem com ácidos graxos insaturados na membrana celular e iniciam o processo de peroxidação lipídica, levando ao estresse oxidativo e apoptose (OMER et al., 2017).



**FIGURA 3. Metabolismo na isquemia e reperfusão. O esquema mostra o consumo de ATP e a lesão microvascular ao final do processo.** Fonte: Figura adaptada de PICCINATO (2008).

### 1.3 Ácido quinurênico (KYNA)

O ácido quinurênico, conhecido como KYNA (Fig. 4), é um produto do metabolismo do triptofano e sua concentração reflete esse metabolismo ao longo de toda a via.

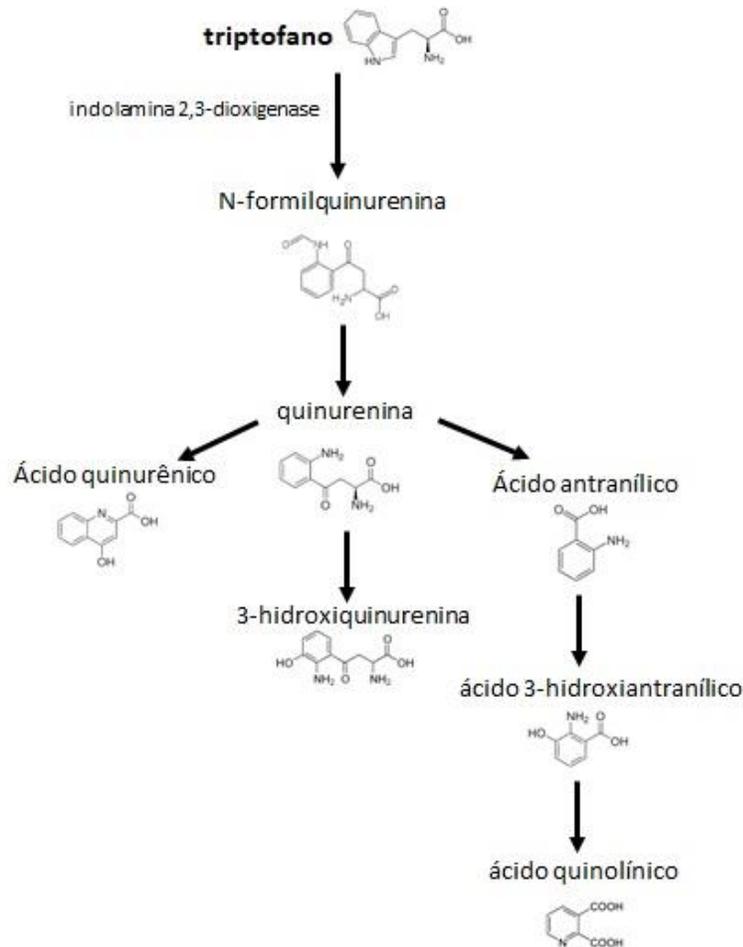


**FIGURA 4. Estrutura do ácido quinurênico.** Fonte: BARTH et al. (2009).

A enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) catalisa a reação inicial da degradação do triptofano na via da quinurenina (KYN). A KYN é então metabolizada em 3-hidroxiquinurenina (3-HK), ácido 3-hidroxi-antranílico (3-HAA) e ácido quinolínico (QUIN) ou ácido quinurênico (KYNA) (Fig. 5). O resultado final da via é a produção de um equivalente nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) para cada molécula de triptofano (NISHIZUKA; HAYAISHI, 1963).

O triptofano é o precursor essencial de serotonina e melatonina no cérebro. O KYNA, seu metabólito, atua com modulador endógeno da neurotransmissão. Nesse sentido, tem sido demonstrado um antagonista endógeno do local de ligação de glicina, um antagonista fraco do receptor AMPA e também um inibidor do receptor nicotínico  $\alpha 7$ , que está envolvido na regulação pré-sináptica do L-glutamato no sistema nervoso central (SAS et al., 2003).

A diminuição de KYNA pode levar ao aumento de excitotoxicidade mediada por glutamato, contribuindo para o desenvolvimento de neurodegeneração e convulsões. Assim, a função neuroprotetora do KYNA tem sido estabelecida (SCHWARCZ et al., 1984; STONE, 2001). Por conta disso, os efeitos protetores das quinureninas endógenas, derivados sintéticos das quinureninas e ácido quinurênico nas doenças neurodegenerativas têm sido estudados (SAS et al., 2003).



**FIGURA 5. Via de degradação do triptofano e formação de metabólitos, dentre eles o ácido quinurênico.**

No entanto, a função do KYNA na periferia ainda é pouco conhecida, e acredita-se que a sua síntese ocorra no coração, rins e fígado (NOGUCHI et al., 1975). Estudos *in vivo* e *in vitro* mostram que o KYNA encontrado no soro seja proveniente do endotélio vascular, regulado por fatores como hipoglicemia e anóxia (STAZKA et al., 2002).

A via quinurênica como um todo desempenha papel importante em vários sistemas biológicos afetados pelo envelhecimento, modulando as alterações celulares relacionadas ao estresse oxidativo, inflamação, respostas cognitivas e imunológicas (GELLÉRT et al., 2011).

Urbańska et al. (2006) e Pedersen et al., (2015) mostraram que os níveis de KYNA no soro estavam elevados em pacientes saudáveis com idade avançada. No entanto, Urbańska et al. (2006) mostraram que houve uma correlação positiva entre KYNA e homocisteína em pacientes saudáveis e com derrame. A homocisteína é um agente que causa estresse oxidativo e estudos experimentais sugerem que ela pode modular os níveis de KYNA na periferia, incluindo anéis de aorta.

Os metabólitos da via da quinurenina possuem atividades antioxidante, imunomoduladora e vasoativa, todas com propriedades importantes quando se trata de doenças cardiovasculares (WANG et al., 2010; GONZALEZ et al., 2008).

Estudos têm demonstrado que a administração de KYNA previne a formação de espécies reativas de oxigênio, atua na atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase e catalase e diminui a formação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e IL-6 (FERREIRA et al., 2020).

#### **1.4 Isquemia e KYNA**

Um conceito introduzido por Murry, Jennings e Reimer (1986) e reflete sobre períodos de isquemia seguida de reperfusão de tecidos, com subsequente proteção contra injúrias causadas pela isquemia do miocárdio. Durante a isquemia, ocorre a liberação de grande número de mediadores químicos, fenômeno chamado pré-condicionamento cardíaco, que leva à contra lesões decorrentes da isquemia.

Nesse sentido, estudos mostram que o KYNA pode atuar como mediador do pré-condicionamento isquêmico, uma vez que foi encontrado no sangue de pacientes, assim como outros metabólitos do triptofano. Após a inibição por 2-oxoglutarate dioxygenases (PHD) houve aumento significativo dos níveis de KYNA. Assim, acredita-se que o KYNA tenha participação protetora após quadros de isquemia e reperfusão (GLEADLE; MAZZONE, 2016).

Um estudo relatou uma correlação inversa entre metabólitos do triptofano e doenças cardiovasculares, e conseqüentemente risco preditivo das doenças, mas ainda

resultados são questionáveis (YU et al., 2017). Como demonstrado neste trabalho de Yu et al. (2017), em um estudo de caso-coorte, baixas concentrações de KYNA e altas concentrações de triptofano estão associadas com baixo risco de eventos cardiovasculares não relacionados com acidente vascular encefálico, como infarto do miocárdio, angina, revascularização e falência renal.

Evidências sugerem que o desbalanço na via das quinureninas está associado a eventos cardiovasculares, como infarto agudo do miocárdio. Ainda, a produção de serotonina propiciada pelo triptofano modula o ritmo cardíaco e pode ter função na ativação do sistema imunológico durante a progressão de doenças cardiovasculares (SHAJIB; KHAN, 2015).

Em modelos animais de isquemia cerebral focal foi vista atividade elevada da via da quinurenina em relação com a inflamação e o estresse oxidativo e também em pacientes com acidente vascular encefálico agudo (COZZI; CARPENEDO; MORONI, 1999; DARLINGTON et al., 2007). No entanto, há poucos estudos sobre o KYNA na isquemia de vasos periféricos.

Além de poucos estudos sobre KYNA como um biomarcador em vasos periféricos, após extensa revisão da literatura não encontramos nenhum trabalho que relate o uso da molécula como um tratamento para isquemia ou outra doença vascular.

## **1.5 Justificativa**

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que a cada ano, 17,3 milhões de pessoas falecem em todo o mundo vítimas de doenças cardiovasculares. A estimativa para 2030 é preocupante, pois o total de óbitos deverá chegar a 23,6 milhões (SOCESP, 2019).

Vários são os fatores de risco associados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, as quais são modificáveis e não modificáveis. Os fatores de risco modificáveis incluem dislipidemia adquirida, tabagismo, etilismo, hiperglicemia, obesidade, sedentarismo, má alimentação e uso de contraceptivos e os não modificáveis incluem história familiar, idade, sexo dentre outras (MAGALHÃES et al., 2014).

O KYNA, molécula que tem sido recentemente explorada quanto à sua capacidade de alteração no sistema cardiovascular, é objeto de estudo do grupo há anos. A *Pipa carvalhoi*, uma espécie de anfíbio da família *Pipidae*, apresentou altas concentrações de KYNA na sua secreção cutânea, especialmente no período de desenvolvimento dos ovos, que ficam depositados na pele da mãe. Nesse momento há um aumento intenso da vascularização na pele do animal, e suspeita-se que possa ser devido à ação do KYNA (MARIANO et al., 2015). A partir desse fenômeno, consideramos o estudo dessa molécula em eventos cardiovasculares, em especial a isquemia e reperfusão, pouco estudada para essa molécula.

Com a crescente quantidade de pacientes que apresentam doenças cardiovasculares, há grande importância em se estudar essa patologia e obter moléculas que alterem ou atrasem a isquemia, ou mesmo que repare os danos causados pela isquemia e reperfusão. Dessa forma, há a tentativa de diminuir o número alarmante de pacientes com doenças isquêmicas, reduzindo a morbimortalidade e também os prejuízos à saúde, além de melhorar a qualidade de vida desses pacientes que são retirados do mercado de trabalho, com prejuízos à toda a família. Assim, este trabalho busca associar o KYNA à reversão da isquemia e reperfusão no sistema periférico, como uma alternativa de tratamento.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar os efeitos do ácido quinurênico (KYNA) na recuperação da função contrátil da aorta de ratos após isquemia e reperfusão e realizar estudos preliminares sobre o mecanismo de ação da molécula, visando um possível tratamento para a patologia.

### **2.2 Específicos**

- Padronizar um modelo de isquemia e reperfusão em aorta de ratos;
- Analisar os efeitos da contratilidade e relaxamento do vaso após a isquemia/reperfusão e o tratamento com KYNA;
- Determinar o perfil de expressão proteica e metabólitos do vaso após a isquemia/reperfusão e o tratamento com KYNA.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

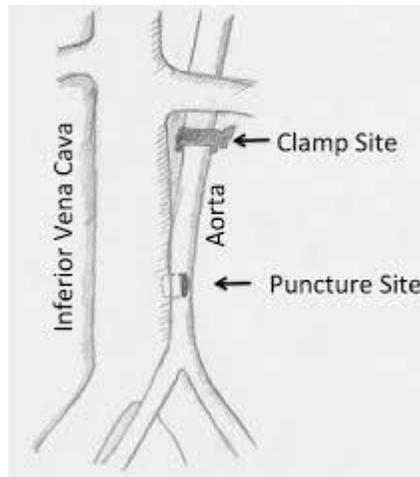
Foram utilizados seis ratos machos da linhagem *Sprague Dawley* pesando entre 250 e 280g. Essa espécie possui uma série de similaridades biológicas, anatômicas e fisiológicas com o ser humano, sendo amplamente utilizada em modelos experimentais de doenças cardiovasculares.

Os animais foram adquiridos no Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade São Francisco (Protocolo: 001.02.2019).

Os ratos foram mantidos a 24°C em ciclos de claro/escuro (12/12h), com ração e água *ad libitum* no Biotério Central da Universidade São Francisco/Bragança Paulista. Estes experimentos foram feitos com a colaboração do Dr. Mario Ângelo Claudino.

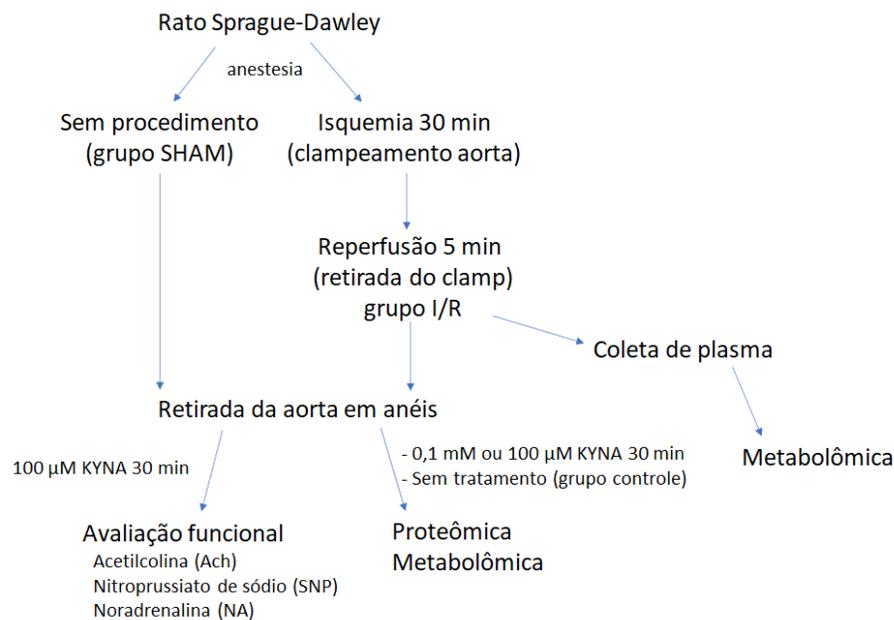
#### 3.2 Isquemia/reperfusão – estudo *ex vivo*

Os ratos foram anestesiados com isoflurano 4% e submetidos à laparotomia ventral abdominal para exposição da aorta e veia cava. A aorta foi exposta e clampeada por 30 minutos. Após isso, o fluxo sanguíneo foi restabelecido e a reperfusão seguiu por 5 minutos (Fig. 6).



**FIGURA 6. Desenho da aorta e locais de interrupção de fluxo sanguíneo (*clamp site*).**  
 Fonte: YAMAMOTO et al (2013).

A aorta e o sangue foram retirados para análise e posteriormente os animais foram eutanaziados por concentração letal de anestésico. Em paralelo, ratos Sham, sem a indução de isquemia/reperfusão (I/R) foram analisados. O esquema geral do protocolo experimental está descrito na Figura 7, com os procedimentos detalhados nos itens a seguir.



**FIGURA 7. Esquema experimental utilizado no trabalho.**

### 3.3 Proteômica

A aorta de ratos induzidos a isquemia/reperfusão foi removida e separada em três pedaços de aproximadamente 4 mm cada: um recebeu PBS (controle), outro 1 mM de KYNA e o terceiro 0,1 mM de KYNA. Após 30 minutos de incubação na solução de Krebs-Ringer (em mM: NaCl 118 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM; glicose 5,6 mM; KCl 4,7 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,17 mM e CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 2,5 mM pH 7,4), aeração por carbogênio O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95:5%), e temperatura constante a 37°C, as aortas foram removidas, o material foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em -80°C para análises.

Os anéis foram macerados em nitrogênio líquido até a formação de um pó, que foi reconstituído em 100 µL tampão de lise contendo 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton-X 100, 2 µg/mL aprotinina, 1 mM PMSF e 2 mM EDTA. A solução foi homogeneizada com a pipeta até a formação de uma solução homogênea. O conteúdo foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado.

No sobrenadante foi feita a quantificação de proteínas pelo método de Bradford, utilizando o reagente *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad, EUA) em microplacas. Cem µL de reagente foi misturado à 10 µL de amostra e após 5 minutos a mistura foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm. O resultado foi comparado a uma curva padrão construída com diferentes concentrações de albumina sérica bovina (200 a 1500 µg/ml).

Uma alíquota de 50µg de proteínas foram adicionadas a 15 µL de ureia 8 M e aquecidos por 15 minutos a 80°C. Em seguida, a mistura foi adicionada a 3 µL de ditiotreititol 100 mM por 30 minutos a 60°C e posteriormente iodoacetamida 300 mM por 30 minutos em temperatura ambiente. Após isso, foram adicionados 100 µL Tris-HCl e 10 µL tripsina 20 ng/nL. A mistura ficou incubada *overnight* a 37°C e então 10 µL de ácido fórmico 0,1% foram adicionados. As amostras foram armazenadas em -20°C até a análise.

Amostras (10 µL) foram inseridas em um sistema de cromatografia líquida (ACQUITY UPLC M-class, Waters Co. EUA) acoplado a uma coluna C18 (3 µm, 100Å, 2.0 mm × 50 mm). A eluição dos peptídeos foi feita por um gradiente binário de

1 a 45% de solvente B (A = ácido fórmico 0,1% em água ultrapura e B = 90% acetonitrila em água ultrapura contendo 0,1% ácido fórmico) em 90 minutos em fluxo constante de 0,2 mL/min. Os peptídeos foram automaticamente inseridos em um espectrômetro de massas (ESI-Q-ToF Xevo GS, Waters Co., EUA), operando em modo positivo, em uma janela de 300 a 1500 m/z. O perfil MS/MS foi obtido pela colisão com gás argônio, aplicado em rampa conforme os estados de carga. O controle do instrumento e aquisição de dados foi feito pelo software MassLinx 4.2.

Para análise, os arquivos brutos (raw) foram inseridos no *software Peaks Studio*<sup>®</sup> 7.0 (Bioinformatics Solution Inc., Canadá) no modo SEARCH para identificação de proteínas. Foi utilizado banco de dados *Uniprot\_SwissProt* com restrição taxonômica para ratos (*Rattus norvegicus*). Foi aplicada tolerância máxima de erro de 0,1 Da para os modos MS e MS/MS, máximo de três clivagens perdidas, carbamidometilação como modificação fixa e oxidação como modificação variável.

### 3.4 Metabolômica

Os anéis de aorta foram submetidos à lise da mesma forma descrita no item “proteômica”. O sobrenadante da lise foi coletado e adicionado à metanol grau MS (1:1 vol:vol) e a solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi inserido em um sistema de cromatografia líquida (ACQUITY UPLC M-class, Waters Co. EUA) acoplado a uma coluna C18 (3 µm, 100Å, 2.0 mm × 50 mm). A eluição dos foi feita por um gradiente binário de 1 a 100% de solvente B (A = ácido fórmico 0,1% em água ultrapura e B = 90% acetonitrila em água ultrapura contendo 0,1% ácido fórmico) em 90 minutos em fluxo constante de 0,2 mL/min. espectrômetro de massas (ESI-Q-ToF Xevo GS, Waters Co., EUA), operando em modo positivo, em uma janela de 100 a 2000 m/z. O perfil MS/MS foi obtido pela colisão com gás argônio. O controle do instrumento e aquisição de dados foi feito pelo *software* MassLinx 4.2.

Os dados brutos foram inseridos no *software* Progenesis QI (Waters Co. EUA) foi feita busca em banco de dados HMDB para identificação de compostos de baixa

massa molecular por similaridade de espectro, massa exata e m/z com tolerância de erro de 0,1 Da.

Em paralelo, o sangue obtido foi coletado em tubos contendo EDTA e posteriormente separados em três alíquotas por animal e colocados em microtubos, com a incubação de 1 ou 0,1 mM de KYNA, diluído em PBS (50 mM, pH 7,3). Na terceira alíquota foi adicionado somente PBS como controle. Após 30 minutos, o sangue foi centrifugado a 3000 x g por 20 minutos a 4°C e o plasma foi separado e mantido a -80°C. Os metabólitos do plasma foram extraídos pela adição de metanol/etanol (1:1 vol:vol) em uma proporção de 3:1 para as amostras. A mistura foi agitada em vórtex por 1 minuto e deixada em gelo por 5 minutos. A amostra foi então centrifugada por 20 minutos a 13000 rpm a 4°C e o sobrenadante analisado por eletroforese capilar acoplada a espectrômetro de massas (CE-MS), em um sistema CE - 7100 Agilent acoplado ao TOF-MS 6224, Agilent). Esse experimento foi conduzido na Universidad de Madri, na Espanha, em colaboração com o Dr. Douglas Mariano.

### 3.5 Isquemia/reperfusão – avaliação funcional

Os ratos (n=6) foram divididos em três grupos experimentais:

- Grupo Sham: animais submetidos ao procedimento cirúrgico sem a indução de isquemia;
- Grupo isquemia-reperfusão (I/R): animais submetidos ao procedimento cirúrgico com indução da isquemia e reperfusão, sem qualquer tratamento;
- Grupo I/R+KYNA: animais submetidos ao procedimento cirúrgico com indução da isquemia, com tratamento *ex-vivo* com KYNA.

Após a indução de isquemia nos ratos, como mencionada no item “isquemia/reperfusão – estudo *ex vivo*”, a aorta foi removida, dissecada, e neste experimento separada em anéis de 4 mm cada.

As estruturas foram imediatamente colocadas em banhos de órgão isolado contendo um volume de 5 mL de solução de Krebs-Ringer. A solução das câmaras foi

continuamente gaseificada com O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95:5%), e mantidas à temperatura de 37°C e pH 7,4.

Cada anel de aorta foi conectado a um gancho de metal, acoplado a um transdutor de força isométrica. A tensão aplicada ao detrusor (10 mN) foi periodicamente ajustada até obter-se a estabilização dos mesmos (60 min). As alterações de tensão foram mensuradas usando transdutores isométricos (AD Instruments, Austrália) e registradas em sistemas PowerLab 4/30 de aquisição de dados (Software versão 7.3, AD Instruments, Austrália)

As respostas contráteis do músculo dos animais normais e isquêmicos, tratados ou não com KYNA (0,1 mM), foram avaliados com o miógrafo.

Foram avaliados o relaxamento dependente do endotélio por meio da construção de curvas de concentração/efeito para o agonista da acetilcolina - ACh (estimulador da liberação do NO endotelial) nos diferentes grupos experimentais. Antes do experimento, foi feito o teste do endotélio com a pré-contracção por 1 µM de noradrenalina, seguida por relaxamento por 1 µM de acetilcolina. Após 30 minutos, o tecido foi lavado e submetido a uma nova pré-contracção por 10 µM de noradrenalina seguida por curva concentração-resposta de acetilcolina (1 nM a 10 µM).

O relaxamento independente do endotélio foi avaliado por meio de curvas de concentração/efeito ao doador de NO, nitroprussiato de sódio (SNP – 1 nM – 10 mM), em anéis pré contraídos com noradrenalina (NA; 10 µM).

O mecanismo contrátil foi avaliado pela construção de curvas de concentração-reposta de noradrenalina (10 nM – 100 µM).

### **3.6 Análise estatística**

Os resultados foram inseridos e analisados no software Prisma, onde também foi utilizado para a construção dos gráficos de concentração-resposta e análise estatística. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão.

Curvas concentração-resposta dos grupos Sham, I/R e I/R+KYNA foram comparadas utilizando o teste ANOVA two-way, com pós teste de *Bonferroni*.

Para os dados metabolômicos, os grupos foram comparados pelo mesmo software de análise das moléculas, utilizando o teste já preconizado pelo programa.

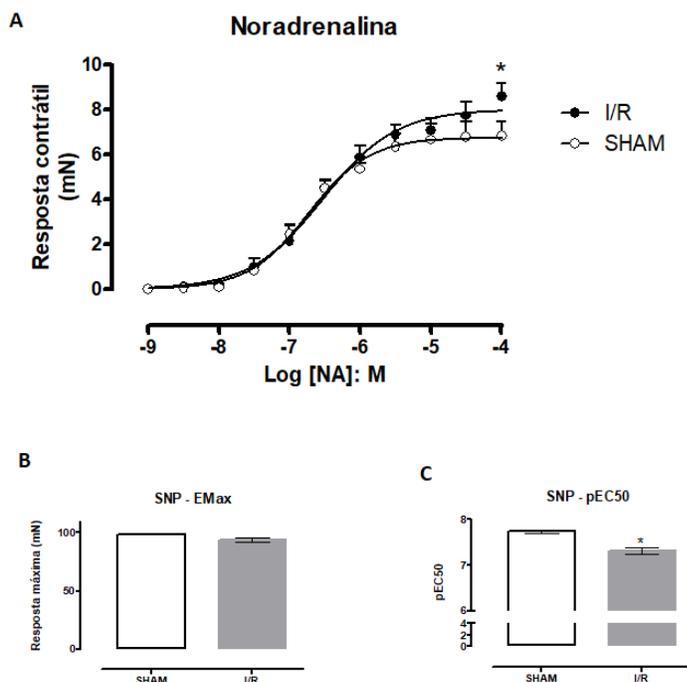
Foram considerados estatisticamente significantes valores de  $p < 0,05$ , indicados nos gráficos apresentados na seção de Resultados.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Padronização da isquemia/reperfusão - avaliação funcional

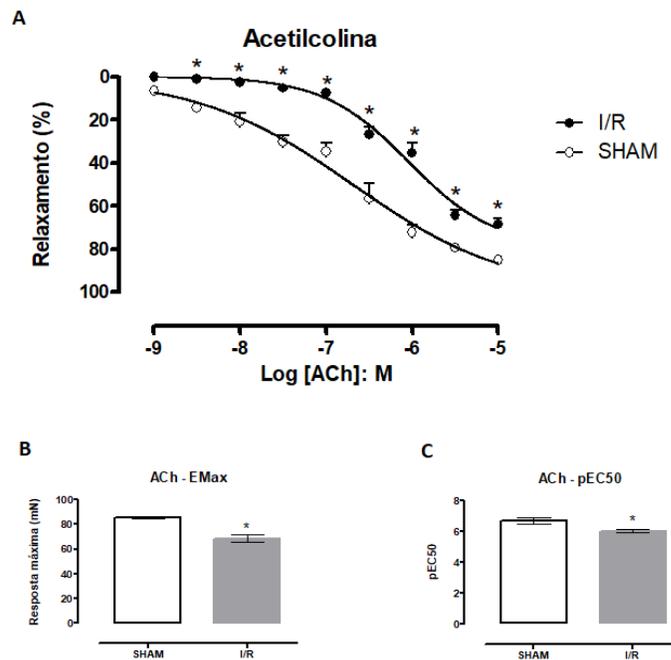
Em um primeiro momento foi feita a padronização da isquemia/reperfusão. Para isso foram comparados ratos com o modelo de isquemia com ratos sem procedimento de isquemia (Sham).

Com relação à noradrenalina, foi observado aumento da resposta contrátil após a isquemia, principalmente em concentrações mais altas (Fig. 8A). Esse resultado é refletido na Figura 8B, em que a resposta máxima à noradrenalina é avaliada, e vemos que o efeito máximo com a isquemia é maior do que no grupo Sham. Por outro lado, o EC50 não foi modificado (Fig. 8C).



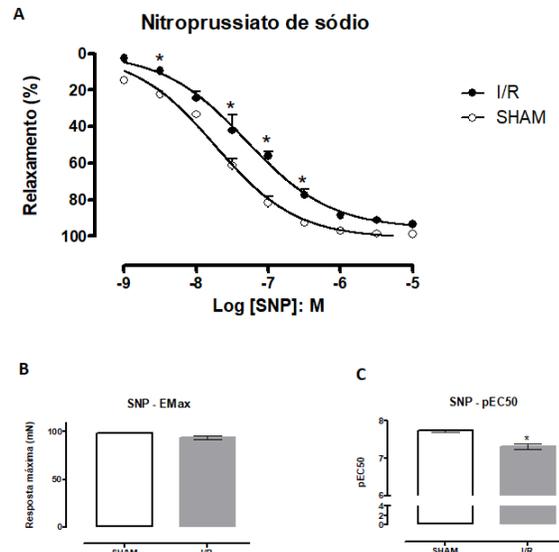
**FIGURA 8. Contração da aorta induzida por noradrenalina (NA), em modelos de ratos normais e submetidos a isquemia. A.** Resposta contrátil em curva concentração-resposta. **B.** Efeito máximo de resposta máxima à NA. **C.** pEC50 da resposta à NA. \*p<0,05

A respeito da acetilcolina, o relaxamento induzido foi significativamente menor no grupo I/R com todas as concentrações testadas (exceto -9 M) com relação ao grupo Sham (Fig. 9A), ou seja, as aortas após isquemia/reperfusão relaxam menos do que um vaso normal. Assim, tanto a resposta máxima (Fig. 9B) quanto o EC50 (Fig. 9C) foram alterados nos animais com isquemia.



**FIGURA 9. Relaxamento da aorta induzida por acetilcolina (ACh), em modelos de ratos normais e submetidos a isquemia. A.** Resposta contrátil em curva concentração-resposta. **B.** Efeito máximo de resposta máxima à ACh. **C.** pEC50 da resposta à ACh. \* $p < 0,05$

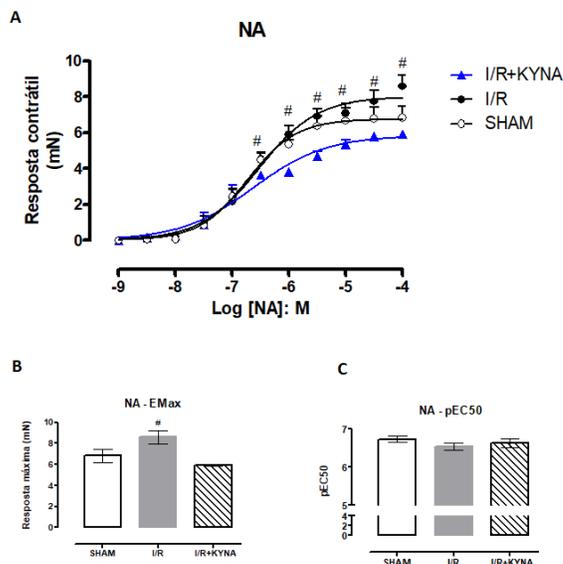
Com o nitroprussiato de sódio, o relaxamento em animais com isquemia também foi menor do que o Sham em concentrações intermediárias (Fig. 10A), sendo o EC50 menor na isquemia (Fig. 10C), enquanto a resposta máxima não houve diferença (Fig. 10B).



**FIGURA 10. Relaxamento da aorta induzida por nitroprussiato de sódio (NPS), em modelos de ratos normais e submetidos a isquemia. A.** Resposta contrátil em curva concentração-resposta. **B.** Efeito máximo de resposta máxima ao NPS. **C.** pEC50 da resposta ao NPS. \* $p < 0,05$

#### 4.2 Efeito do KYNA da isquemia/reperfusão - avaliação funcional

Quando o KYNA foi incubado com a aorta, esta teve uma diminuição na resposta contrátil em comparação com os grupos Sham e I/R. A diferença foi estatisticamente significativa entre os grupos I/R e I/R+KYNA nas concentrações mais altas. Esses resultados apontam a ação do KYNA na diminuição da contratilidade que estava exacerbada na condição isquêmica (Fig. 11 A-C).

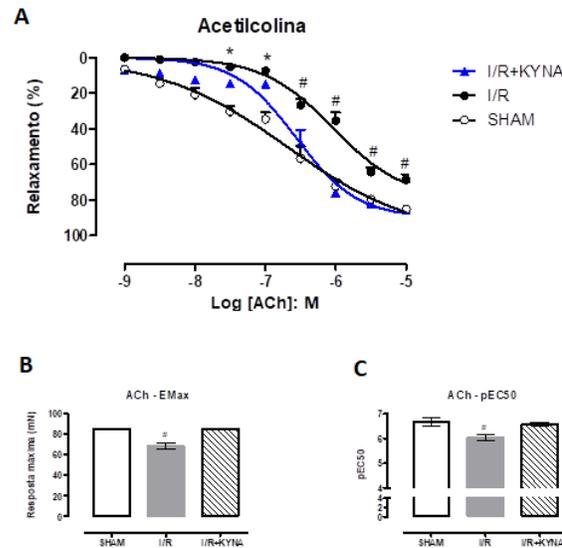


**FIGURA 11. Contração da aorta induzida por noradrenalina (NA), em condições de isquemia e tratamento com KYNA. A.** Resposta contrátil em curva concentração-resposta. **B.** Efeito máximo de resposta máxima à NA. **C.** pEC50 da resposta à NA. #  $p < 0,05$  entre I/R e I/R + KYNA.

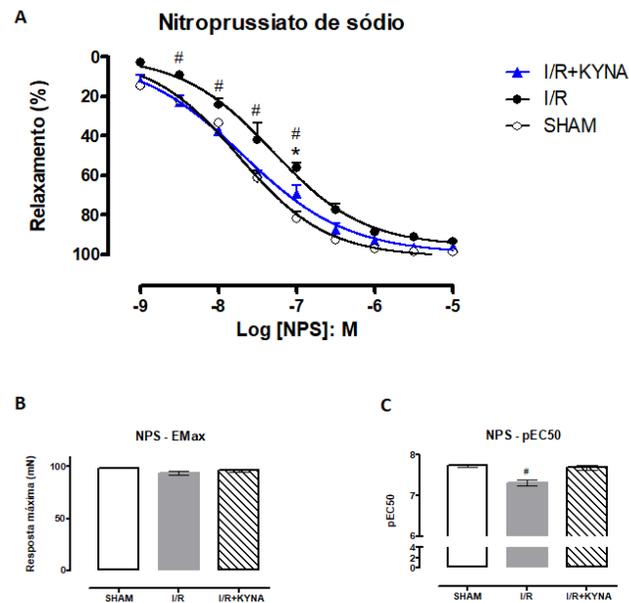
Na avaliação do relaxamento induzido por acetilcolina, a incubação de KYNA fez com que a condição isquêmica retornasse aos níveis normais, principalmente em concentrações mais altas do agonista. Dessa forma, a curva concentração-resposta do KYNA com isquemia se assemelha ao grupo Sham, que retorna a um relaxamento normal, em comparação com o grupo isquemia, em que há um menor relaxamento (Fig. 12A).

A resposta máxima (Fig. 12B) e EC50 (Fig. 12C) do grupo KYNA isquemia foi estatisticamente diferente do grupo isquemia e igual ao controle, reforçando o dado de retorno ao relaxamento normal.

Com o uso de nitroprussiato de sódio, não houve alteração na resposta máxima com a incubação de KYNA (Fig. 13B), no entanto o EC50 foi estatisticamente diferente do grupo KYNA isquemia com o grupo isquemia (Fig. 13C), no mesmo padrão da acetilcolina, ou seja, um relaxamento similar ao Sham com o uso da molécula (Fig. 13A).



**FIGURA 12. Relaxamento da aorta induzida por acetilcolina (ACh), em condições de isquemia e tratamento com KYNA. A.** Resposta contrátil em curva concentração-resposta. **B.** Efeito máximo de resposta máxima à ACh. **C.** pEC50 da resposta à ACh. \* $p < 0,05$  entre Sham e I/R + KYNA; #  $p < 0,05$  entre I/R e I/R + KYNA



**FIGURA 13. Relaxamento da aorta induzida por nitroprussiato de sódio (NPS), em condições de isquemia e tratamento com KYNA. A.** Resposta contrátil em curva concentração-resposta. **B.** Efeito máximo de resposta máxima ao NPS. **C.** pEC50 da resposta ao NPS. \* $p < 0,05$  entre Sham e I/R + KYNA; #  $p < 0,05$  entre I/R e I/R + KYNA

### 4.3 Metabolômica

A partir de análises do plasma, foi possível identificar alguns metabólitos nas condições de isquemia e posterior tratamento com KYNA. A Tabela 1 mostra a identificação de compostos que foram estatisticamente diferentes entre o grupo controle (sem tratamento com KYNA) e o grupo incubado com KYNA (0,1 ou 1 mM). Não houve diferença entre as duas concentrações de KYNA utilizadas.

**TABELA 1.** Identificação de metabólitos no plasma de ratos isquêmicos tratados com 0,1 ou 1 mM de KYNA, significativamente diferentes do grupo controle (sem tratamento com KYNA).

Composto	Fórmula molecular	Massa molecular	Valor de p
2-amino-3-oxobutanoato	C4H7NO3	117,04259	0,0282
Acetilglicina	C4H7NO3	117,04259	0,0282
Espermidina	C7H19N3	145,1579	0,0164
2-isopropilaminoetilamina	C5H14N2	102,1157	0,0004
N-metilputrescina	C5H14N2	102,1157	0,0004
Cadaverina	C5H14N2	102,1157	0,0004
N6,N6,N6-trimetil-L-lisina	C9H20N2O2	188,15248	0,0113
7,8-ácido diamino nonanóico	C9H20N2O2	188,15248	0,0113
Trietanolamina	C6H15NO3	149,10519	0,0115
Proiliglicina	C7H12N2O3	172,08479	0,0004
Ácido aspártico	C4H7NO4	133,03751	0,0004
Ácido iminodiacético	C4H7NO4	133,03751	0,0004
Galactosilglicerol	C9H18O8	254,10017	0,0399
2-O-(alfa-D-glicopiranosil)glicerol	C9H18O8	254,10017	0,0399
Hidroximetilbilano	C40H46N4O17	854,2858	0,0006

Quando os metabólitos foram analisados na aorta, foi possível encontrar compostos diferentes do plasma, como esperado. A Tabela 2 mostra a lista de metabólitos identificados, comparando grupo controle com o grupo tratado com KYNA. Além da identificação, a tabela mostra qual grupo teve a média mais alta ou mais baixa, ou seja, em algumas situações, houve aumento da concentração do metabólito com o KYNA, como por exemplo o ácido poliguanílico, e em outras o KYNA causou diminuição da concentração do metabólito, como por exemplo o 16E-18-Oxo-18-CoA-dinor-LTE4.

**TABELA 2.** Identificação de compostos na aorta de ratos isquêmicos, diferentes do grupo controle (sem tratamento) e tratado com 0,1 ou 1 mM de KYNA.

m/z	z	Valor de p	Média mais alta	Média mais baixa	Composto
1012,149	1	0,011	CT	0,1 mM	ácido poliguanílico
1232,325	1	0,012	100uM	CT	16E-18-Oxo-18-CoA-dinor-LTE4
1201,604	1	0,018	CT	0,1 mM	Jujuboside C
1054,204	1	0,018	CT	0,1 mM	Luteolin 7-[E-feruloyl-(->2)-glucuronyl-(1->2)-glucuronide] 4'-glucuronide
833,6426	1	0,02	CT	0,1 mM	TG(14:1(9Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))
1012,4	1	0,024	CT	0,1 mM	Ovomotide
799,7166	1	0,033	CT	0,1 mM	TG(15:0/14:1(9Z)/o-18:0)
987,5169	1	0,047	1mM	CT	Aeruginopeptin 917S-C

#### 4.4 Proteômica

Após análises proteômicas da aorta, foi possível identificar proteínas secretadas pelos vasos isquêmicos após o tratamento com KYNA. A Tabela 3 mostra as proteínas que estavam expressas no tratamento com 0,1 ou 1 mM de KYNA, e que não estavam presentes no grupo controle, sem o tratamento. Por essa razão, proteínas estruturais como actina, miosina e hemoglobina, não estão mostradas.

*continuação***TABELA 3.** Identificação de proteínas na aorta isquêmica, diferentes do grupo controle (sem tratamento) e tratado com 0,1 ou 1 mM de KYNA.

acesso	-10lgP	Peptídeos	Massa média	Descrição
O88278 CELR3_RAT	40.56	3	359356	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3
P63251 KCNJ3_RAT	22.83	1	56573	G protein-activated inward rectifier potassium channel 1
Q4V8A2 CDC27_RAT	22.83	1	91663	Cell division cycle protein 27 homolog
Q9QXQ0 ACTN4_RAT	22.83	1	104915	Alpha-actinin-4
Q9WVR3 SHIP2_RAT	20.80	1	139142	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 2
O08557 DDAH1_RAT	20.74	1	31426	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase
Q9JLH5 CK5P2_RAT	20.41	1	215480	CDK5 regulatory subunit-associated protein 2
P04797 G3P_RAT	32.57	1	35828	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Q6U6G5 ZC3HF_RAT	26.55	1	48299	Zinc finger CCCH domain-containing protein 15
D3ZSK5 SETD6_RAT	26.55	1	53362	N-lysine methyltransferase SETD6 1
P11884 ALDH2_RAT	26.55	1	56488	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial
Q56R16 IMA6_RAT	26.55	1	60299	Importin subunit alpha-6
Q9QZ48 ZBT7A_RAT	26.55	1	60543	Zinc finger and BTB domain-containing protein 7A
B2RYD6 TT30B_RAT	26.55	1	76077	Tetratricopeptide repeat protein 30B
Q5FWS6 KAZRN_RAT	26.55	1	86974	Kazrin
O54861 SORT_RAT	26.55	1	91169	Sortilin
Q8VHN2 NMD3B_RAT	26.55	1	109158	Glutamate receptor ionotropic, NMDA 3B

*continuação***TABELA 3.** Identificação de proteínas na aorta isquêmica, diferentes do grupo controle (sem tratamento) e tratado com 0,1 ou 1 mM de KYNA.

acesso	-10lgP	Peptídeos	Massa média	Descrição
Q63475 PTPR2_RAT	26.55	1	111863	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase
Q5RKH1 PRP4B_RAT	26.55	1	117006	Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog
G3V7Q0 DEN5A_RAT	26.55	1	146637	DENN domain-containing protein 5A
Q62717 CAPS1_RAT	26.55	1	146266	Calcium-dependent secretion activator 1
Q0V8T6 CTP5A_RAT	26.55	1	145530	Contactin-associated protein like 5-1
Q0V8T3 CTP5D_RAT	26.55	1	145919	Contactin-associated protein like 5-4
P49816 TSC2_RAT	26.55	1	201277	Tuberin
P70478 APC_RAT	26.55	1	310533	Adenomatous polyposis coli protein
P13264 GLSK_RAT	26.14	1	74024	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial
A1L1L1 CENPW_RAT	25.47	1	9803	Centromere protein W
P30100 C11B3_RAT	24.47	1	57122	Cytochrome P450 11B3, mitochondrial
P30099 C11B2_RAT	24.47	1	58241	Cytochrome P450 11B2, mitochondrial
E9PU28 IMDH2_RAT	24.47	1	55815	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2
Q5FWT1 FA98A_RAT	24.47	1	55070	Protein FAM98A
O88873 GMEB2_RAT	24.47	1	56571	Glucocorticoid modulatory element-binding protein 2
P24155 THOP1_RAT	24.47	1	78386	Thimet oligopeptidase
Q6DKG0 NAA35_RAT	24.47	1	83210	N-alpha-acetyltransferase 35, NatC auxiliary subunit

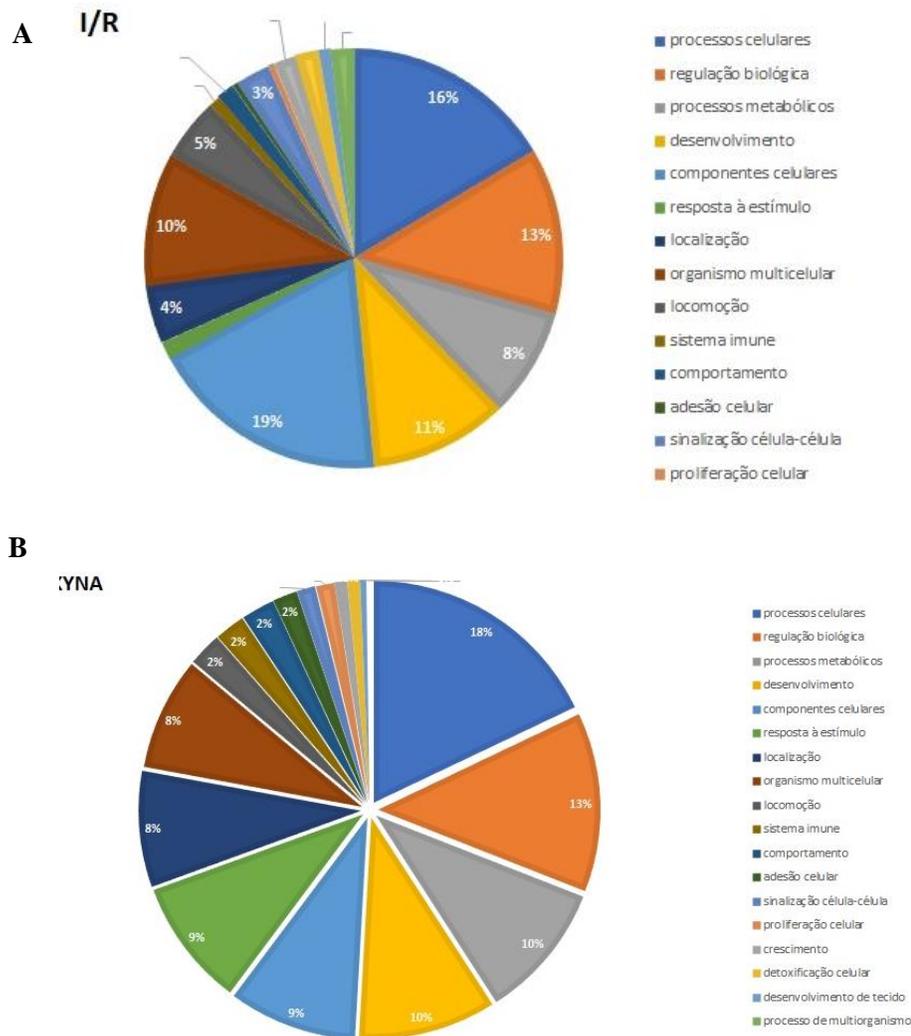
*continuação***TABELA 3.** Identificação de proteínas na aorta isquêmica, diferentes do grupo controle (sem tratamento) e tratado com 0,1 ou 1 mM de KYNA.

acesso	10lgP	Peptídeos	Massa média	Descrição
Q498T9 LRC8C_RAT	24.47	1	92463	Volume-regulated anion channel subunit LRRC8C
P0DJJ3 SGIP1_RAT	24.47	1	88585	SH3-containing GRB2-like protein 3-interacting protein 1
O54963 REST_RAT	24.47	1	117126	RE1-silencing transcription factor
P70628 IMPG2_RAT	24.47	1	137547	Interphotoreceptor matrix proteoglycan 2
Q7M6Z5 KIF27_RAT	24.47	1	158879	Kinesin-like protein KIF27
D4ACX8 PCD16_RAT	24.47	1	345982	Protocadherin-16
Q6PCU8 NDUV3_RAT	23.57	1	11942	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial
P18280 NTF3_RAT	23.57	1	29645	Neurotrophin-3
Q5U308 LRC8D_RAT	23.57	1	97940	Volume-regulated anion channel subunit LRRC8D
O35078 OXDA_RAT	23.27	1	38820	D-amino-acid oxidase
Q63468 KPRA_RAT	23.27	1	39436	Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 1
Q9EQY6 PIGM_RAT	23.27	1	49594	GPI mannosyltransferase 1
Q9JM01 CDKL3_RAT	23.27	1	67553	Cyclin-dependent kinase-like 3
F1MA98 TPR_RAT	23.20	1	267303	Nucleoprotein TPR
Q9JLU4 SHAN3_RAT	22.94	1	186375	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 3
P62628 DLRB1_RAT	22.79	1	10990	Dynein light chain roadblock-type 1
P39069 KAD1_RAT	22.79	1	21584	Adenylate kinase isoenzyme 1
P19999 MBL1_RAT	22.79	1	25308	Mannose-binding protein A
Q5I0K3 CLYBL_RAT	22.79	1	37321	Citramalyl-CoA lyase, mitochondrial
Q9Z214 HOME1_RAT	22.79	1	41305	Homer protein homolog 1
P13234 KCC4_RAT	22.79	1	53151	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV
P15087 CBPE_RAT	22.79	1	53309	Carboxypeptidase E
Q4V886 PAF1_RAT	22.79	1	60546	RNA polymerase II-associated factor 1 homolog

*continuação***TABELA 3.** Identificação de proteínas na aorta isquêmica, diferentes do grupo controle (sem tratamento) e tratado com 0,1 ou 1 mM de KYNA.

acesso	10lgP	Peptídeos	Massa média	Descrição
Q63147 HEM0_RAT	22.79	1	64842	5-aminolevulinate synthase, erythroid-specific, mitochondrial
Q66H68 RBM47_RAT	22.79	1	64094	RNA-binding protein 47
P18886 CPT2_RAT	22.79	1	74110	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial
Q9JHZ4 GRAP1_RAT	22.79	1	96074	GRIP1-associated protein 1
Q9JI03 CO5A1_RAT	22.79	1	183986	Collagen alpha-1(V) chain
D3ZBP4 MICA1_RAT	22.79	1	116672	[F-actin]-monooxygenase MICAL1
O88778 BSN_RAT	21.03	1	418429	Protein bassoon
Q9R172 NOTC3_RAT	21.03	1	244299	Neurogenic locus notch homolog protein 3
P0DSP1 SORL_RAT	20.96	1	247314	Sortilin-related receptor
P54370 OAZ1_RAT	20.69	1	25228	Ornithine decarboxylase antizyme 1
O09027 ACKR2_RAT	20.69	1	43293	Atypical chemokine receptor 2
Q769K2 NAPEP_RAT	20.69	1	45723	N-acyl-phosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D
P54287 CACB3_RAT	20.69	1	54564	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-3
Q66H58 INT14_RAT	20.69	1	57144	Integrator complex subunit 14
Q568Z0 T11L2_RAT	20.69	1	57980	T-complex protein 11-like protein 2
B0LPN4 RYSR2_RAT	20.69	1	562963	Ryanodine receptor 2
A0A0G2JTR4 ABR_RAT	20.69	1	97693	Active breakpoint cluster region-related protein
Q9QUH6 SYGP1_RAT	20.69	1	144722	Ras/Rap GTPase-activating protein SynGAP
O54889 RPA1_RAT	20.67	1	194191	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1

A Figura 14 mostra os gráficos das proteínas separadas por função biológica, comparando o grupo I/R (A) com o grupo tratado com KYNA (B). É possível verificar a diferença entre os dois, principalmente em termos de processos celulares e metabólicos, componentes celulares e resposta aos estímulos.



**FIGURA 14. Funções biológicas das proteínas encontradas na aorta de ratos. (A) controle; (B) tratado com 0.1 ou 1 mM de KYNA.**

## 5 DISCUSSÃO

O ácido quinurênico, um intermediário na via metabólica do triptofano, é um bloqueador competitivo endógeno do sítio co-agonista da glicina não sensível à estricnina do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), e um inibidor não competitivo dos receptores nicotínicos alfa-7. Portanto, no sistema nervoso central, o KYNA é considerado participante da neurotransmissão glutamatérgica e colinérgica (SAS et al., 2003).

A homeostase alterada foi implicada em uma série de condições patológicas como distúrbios neurodegenerativos, metabólicos ou cardiovasculares. Assim, a presença de ácido quinurênico tem sido documentada não apenas no tecido cerebral e líquido cefalorraquidiano (TURSKI et al., 1988), mas também na periferia (PARADA-TURSKA et al., 2006).

Na periferia, o compartimento endotelial gera grandes quantidades de KYNA e esse processo é modificado, entre outros, pela composição do meio iônico, disponibilidade de oxigênio e glicose, função do sistema de óxido nítrico ou concentração extracelular de homocisteína (ZAPOLSKI et al., 2020).

O KYNA apresenta importante propriedade antioxidante por meio de sua capacidade de eliminar diferentes radicais livres, além de reduzir a lesão em diferentes órgãos (LUGO-HUITRÓN et al., 2011; GARCÍA-LARA et al., 2015). Entretanto, os efeitos sistêmicos e o envolvimento de moléculas da via da quinurenina em doenças cardiovasculares ainda não foram totalmente elucidados. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do KYNA na recuperação da funcionalidade da aorta após I/R em modelo animal.

A isquemia de aorta seguida de reperfusão pode ser encontrada em vários quadros clínicos, como aneurisma de aorta abdominal ou reparo de dissecação, tromboembolismo agudo com aterosclerose aórtica ou cirurgia de trauma. Tais cenários estão associados a altas taxas de mortalidade e morbidade devido a resposta inflamatória sistêmica que ocorre durante essa fase. Após a liberação do *clamp* vascular, o fluxo sanguíneo é restaurado desencadeando uma resposta de isquemia-reperfusão, levando a muitos processos fisiopatológicos como inflamação, alterações

humorais e circulação de metabólitos que podem ocasionar lesões em múltiplos órgãos (ZAMMERT; GELMAN, 2016). A reperfusão de aorta isquêmica pode ocasionar a superprodução de espécies reativas do oxigênio (EROs) e moléculas pró-inflamatórias, sendo que a resposta inflamatória subsequente é um dos principais mecanismos que inicia a lesão, especialmente nos pulmões e órgãos vitais (por exemplo, rim e coração), com elevado índice de morbidade (YASSIN et al., 2002).

De acordo com os resultados de estudos experimentais referidos na literatura, não existe uma padronização com relação aos períodos de tempo de isquemia e reperfusão para a ocorrência de alterações ou lesões teciduais. Santos et al. (2008) mostraram que com 30 minutos de isquemia seguidos de 60 minutos de reperfusão, podem ocorrer danos na mucosa intestinal. Rocha et al. (2012) observaram correlação positiva entre o grau da lesão histológica e o aumento do tempo de isquemia da aorta abdominal (0, 30, 45, 60 e 90 minutos). Em nossa pesquisa, padronizamos o tempo de clampeamento da aorta em 30 minutos e, após o restabelecimento do fluxo sanguíneo, foi realizada reperfusão por 5 minutos. Observou-se aumento da resposta contrátil após isquemia com concentrações mais altas de noradrenalina, e menor relaxamento dependente do endotélio causado pela acetilcolina e nitroprussiato de sódio.

O endotélio é formado por uma monocamada de células, sendo responsável pela regulação do tônus vascular que ocorre por meio da liberação de substâncias vasoativas, como o EDRF (do inglês *Endothelium-Derived Relaxing Factor*), e fatores contráteis derivados do endotélio (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Enquanto a visão convencional atribuía o processo de dano tecidual à própria isquemia, Bulkley (1987) observou que uma proporção variável da lesão, mas muitas vezes substancial, é causada por metabólitos tóxicos [radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila (OH)] que são gerados a partir da xantina oxidase no momento da reperfusão. O endotélio vascular é particularmente suscetível a danos por EROs, e a disfunção endotelial que ocorre após I/R é caracterizada pela redução acentuada no relaxamento dependente do endotélio devido a diminuição da liberação ou ação de EDRFs (LEE et al., 2013).

Nesse sentido, o papel antioxidante do KYNA foi demonstrado por Lugo-Huitrón et al. (2011), em que concentrações de 100 a 300  $\mu\text{M}$  tiveram atividade sequestradora de elétrons e foi capaz de inibir o estresse oxidativo. Da mesma forma, o KYNA pode ter agido na redução do estresse oxidativo e inflamação da aorta no nosso modelo de isquemia e reperfusão, contribuindo para a restauração da funcionalidade do vaso sanguíneo após a I/R.

Neste trabalho, estudos metabolômicos possibilitaram a identificação de moléculas envolvidas na diminuição do estresse oxidativo, como a esperimidina e outras poliaminas. Essas moléculas foram relacionadas com a redução da apoptose e necrose de miócitos devido à redução de óxido nítrico, promovendo recuperação após I/R (KIM, 2017).

A liberação de EROs, além de levar a célula à apoptose e necrose, causa extensa inflamação, que contribui com o quadro de I/R. O KYNA, portanto, ao controlar o estresse oxidativo, diminui a inflamação no local afetado, o que pode contribuir para o restabelecimento da funcionalidade do vaso.

As técnicas metabolômicas têm sido rotineiramente usadas por oferecerem um meio sensível para a identificação de moléculas em biofluidos humanos. Devido ao desenvolvimento em informática e tecnologias analíticas e à integração de abordagens biológicas ortogonais, tornou-se possível expandir as análises para compreender os efeitos dos metabólitos em nível de sistema (JOHNSON et al., 2016).

As plataformas analíticas mais comumente usadas para identificar e quantificar metabólitos são a cromatografia gasosa ou líquida combinada com espectrometria de massas (EM), e ressonância magnética nuclear que, em geral, apresenta boa reprodutibilidade, mas menor sensibilidade em comparação com a EM (SONG et al., 2019). Para a determinação dos metabólitos presentes no plasma e na aorta de animais submetidos à isquemia e posteriormente tratados com diferentes concentrações de KYNA (0,1 ou 1 mM), foram utilizadas as técnicas de cromatografia gasosa e líquida. Foi observada diferença entre o número total de metabólitos identificados no plasma sanguíneo e na aorta (15 *versus* 8, respectivamente).

Muitas moléculas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos foram observadas, em função do KYNA ter relação com a via do triptofano.

Além disso, é importante ressaltar a identificação de hydroxymethylbilane no plasma tratado com KYNA, metabólito importante na síntese de porfirinas, essencial para a constituição da hemoglobina e conseqüentemente transporte e oxigênio, condição importante após um quadro de I/R (BEGLEY; ORTIZ DE MONTELLANO, 2008).

A esperimidina, identificada neste trabalho, tem função de alteração na permeabilidade de membrana e homeostase de  $Ca^{2+}$  citosólico (MADEO et al., 2018). Isso pode contribuir com o controle da liberação de neurotransmissores na aorta, o que explica a reversão da funcionalidade do vaso, observada por estudos de contração e relaxamento com ferramentas farmacológicas.

Os efeitos neuroprotetores do ácido quinurênico em processos degenerativos (ZWILLING et al., 2011) e em mecanismos inflamatórios e imunológicos (VÉCSEI et al., 2013), e o papel como agonista do receptor acoplado à proteína G (GPR35) que pode contribuir para a diminuição do glutamato, bem como para a liberação de mediador pró-inflamatório da glia e células imunes por meio de cAMP atenuado e concentração intracelular de  $Ca^{2+}$ , têm sido amplamente divulgados na literatura (COSI et al., 2011).

No presente estudo, anéis aórticos previamente submetidos a isquemia foram tratados com KYNA (0,1 mM) e avaliados em relação ao relaxamento dependente do endotélio. Observou-se que a incubação com KYNA conseguiu reverter a condição isquêmica induzida pela acetilcolina ao padrão basal de relaxamento (grupo Sham). Em contrapartida, com o nitroprussiato de sódio não houve alteração na resposta máxima após incubação com KYNA, embora tenha alcançado relaxamento similar ao da ACh. Esses dados sugerem fortemente que o KYNA, por ser considerado um potencial antioxidante, sendo capaz de remover as espécies reativas de oxigênio, pode evitar o comprometimento do relaxamento dependente do endotélio.

A análise proteômica envolve o uso de tecnologia altamente complexa de rastreamento de proteínas. As informações obtidas podem ser usadas em combinação com dados genômicos fornecendo informações acerca dos mecanismos biológicos subjacentes a

determinadas patologias (CHAPMAN et al., 2014). Neste estudo, empregamos a técnica de EM para gerar um perfil proteômico que englobasse informações sobre as proteínas secretadas pelos vasos sanguíneos, após o tratamento com ácido quinurênico. Diferenças significativas relacionadas aos processos celulares e metabólicos, e componentes celulares foram observadas entre os grupos controle e KYNA, o que mostra a influência na molécula em eventos celulares e moleculares.

Foram identificadas diversas proteínas que atuam no metabolismo de carboidratos e proteínas em ambiente citosólico e mitocondrial.

Além disso, proteínas de metabolismo de cálcio foram observadas, como a proteína ativadora de secreção dependente de cálcio (Q62717|CAPS1\_RAT), que está envolvida com exocitose de vesículas contendo neurotransmissores, e responsável por regular o conteúdo de catecolaminas em vesículas densas, dependentes de cálcio (TANDON et al., 1998).

Essa proteína com expressão aumentada em relação ao grupo controle (que não recebeu o tratamento com KYNA), pode indicar uma maior regulação da liberação de neurotransmissores, refletido nos estudos funcionais, em que a contração e o relaxamento da aorta causados por agonistas exógenos foram modificados após o tratamento.

A proteína Ptpn2 (Receptor tirosina fosfatase N2) também está relacionada ao processo de secreção mediado por vesícula, necessário para o estoque de noradrenalina, dopamina e serotonina, o que também pode contribuir para o controle na liberação de neurotransmissores após o tratamento com KYNA.

Ainda com relação à contratilidade e relaxamento da aorta, a proteína Kcnj3, um canal de potássio voltagem-dependente ativado por proteína G, permite e controla o fluxo de potássio para dentro da célula, importante para o controle da neurotransmissão (KANO et al., 2019).

Outra proteína expressa após o tratamento com KYNA foi a Zc3h15 (proteína 15 contendo domínio CCG Zinc finger), que atua na proteção contra degradação proteolítica, fenômeno que ocorre após a isquemia. A ativação de enzimas pode comprometer os vasos sanguíneos por causar degradação da matriz extracelular microvascular e desarranjo do vaso (FUKUDA et al., 2004). O KYNA, por aumentar

os níveis dessa proteína, diminui a lesão da aorta causada pela I/R, o que explica a recuperação da sua função.

NADH desidrogenase também foi identificada na aorta, enzima importante no controle do estresse oxidativo em vários tecidos, incluindo vasos sanguíneos (YOKOYAMA et al., 2000).

Desta forma, após estudos de metabolômica e proteômica, foi possível identificar mecanismos de ação do KYNA na reversão da funcionalidade da aorta após isquemia e reperfusão. Esses dados levam à condução de estudos mais aprofundados que possam elucidar o mecanismo de atuação do KYNA focado no estresse oxidativo, inflamação e controle da neurotransmissão da aorta. Assim, esse estudo abre perspectivas para um novo tratamento da isquemia, particularmente no reparo dos danos causados que a patologia causa aos vasos sanguíneos, condição que acomete milhares de pessoas todos os anos.

## 6 CONCLUSÃO

O ácido quinurênico recuperou a funcionalidade da aorta de ratos, tanto na contração quanto no relaxamento, após uma condição de isquemia e reperfusão.

Essa reversão do quadro isquêmico se deu pela atuação da molécula no controle do estresse oxidativo e da inflamação na redução da lesão, condições conhecidas da patologia, além de ter aumentado a síntese de moléculas importantes para o transporte de oxigênio. Além disso, o KYNA aumentou a expressão de proteínas que controlam a liberação de cálcio e síntese de vesículas contendo neurotransmissores, atuando na modulação da função contrátil da aorta. Também aumentou os níveis de proteínas responsáveis pela inibição da atividade proteolítica, diminuindo assim a lesão vascular.

Sendo assim, o KYNA demonstrou ter potencial para ser utilizado como um tratamento farmacológico após uma condição isquêmica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEGLEY, T.P.; ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. Hemes in biology. In: BEGLEY, T.P. **Wiley Encyclopedia of Chemical Biology**. John Wiley & Sons, 2008.

BENEDITO, S.; PRIETO, D.; NIELSEN, P.J.; NYBORG, N.C. Role of the endothelium in acetylcholine-induced relaxation and spontaneous tone of bovine isolated retinal small arteries. **Exp. Eye Res.**, v.52, n.5, p.575-579, 1991.

BULKLEY, G.B. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. **Br. J. Cancer Suppl.**, v.8, p.66-73, 1987.

CHAPMAN, J.D.; GOODLETT, D.R.; MASSELON, C.D. Multiplexed and data-independent tandem mass spectrometry for global proteome profiling. **Mass Spectrom Rev.**, v.33, n.6, p.452-470, 2014.

COSI, C.; MANNAIONI, G.; COZZI, A.; CARLÀ, V.; SILI, M.; CAVONE, L.; MARATEA, D.; MORONI, F. G-protein coupled receptor 35 (GPR35) activation and inflammatory pain: studies on the antinociceptive effects of kynurenic acid and zaprinast. **Neuropharmacology**, v.60, n.7-8, p.1227-1231, 2011.

COZZI, A.; CARPENEDO, R.; MORONI, F. Kynurenine hydroxylase inhibitors reduce ischemic brain damage: studies with (m-nitrobenzoyl)-alanine (mNBA) and 3, 4-dimethoxy-[N-4-(nitrophenyl) thiazol-2yl]-benzenesulfonamide (Ro 61-8048) in models of focal or global brain ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v.19, n.7, p.771-777, 1999.

CUNHA, M.S.; SILVA, J.C.; NAKAMOTO, H.A.; FERREIRA, M.C. Study of warm ischemia followed by reperfusion on a lower limb model in rats: effect of allopurinol and streptokinase. **Clinics**, v.60, n.3, p.213-220, 2005.

DARLINGTON, L.G.; MACKAY, G.M.; FORREST, C.M.; STOY, N.; GEORGE, C.; STONE, T.W. Altered kynurenine metabolism correlates with infarct volume in stroke. **Eur. J. Neurosci.**, v.26, n.8, p.2211-2221, 2007.

DATASUS. **Infarto agudo do miocárdio é a primeira causa de mortes no país, revela dados do DATASUS 2014**. Disponível em: <http://datasus.saude.gov.br/noticias/atualizacoes/559-infarto-agudo-do-miocardio-e-primeira-causa-de-morte-no-pais-revela-dados-do-datasus>. Acesso em: 10 nov. 2019.

FERREIRA, F.S.; SCHMITZ, F.; MARQUES, E.P.; SIEBERT, C.; WYSE, A.T.S. Intrastratial quinolinic acid administration impairs redox homeostasis and induces inflammatory changes: prevention by kynurenic acid. **Neurotox Res.**, v.38, n.1, p.50-58, 2020.

FUKUDA, S.; FINI, C.A.; MABUCHI, T.; KOZIOL, J.A.; EGGLESTON, L.L. JR; DEL ZOPPO, G.J. Focal cerebral ischemia induces active proteases that degrade microvascular matrix. **Stroke**, v.35, n.4, p.998-1004, 2004.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v.288, n.5789, p.373-376, 1980.

GARCÍA-LARA, L.; PÉREZ-SEVERIANO, F.; GONZÁLEZ-ESQUIVEL, D.; ELIZONDO, G.; SEGOVIA, J. Absence of aryl hydrocarbon receptors increases endogenous kynurenic acid levels and protects mouse brain against excitotoxic insult and oxidative stress. **J. Neurosci. Res.**, v.93, n.9, p.1423-1433, 2015.

GELLÉRT, L.; FUZIK, J.; GÖBLÖS, A.; SÁRKÖZI, K.; MAROSI, M.; KIS, Z.; FARKAS, T.; SZATMÁRI, I.; FÜLÖP, F.; VÉCSEI, L.; TOLDI, J. Neuroprotection with a new kynurenic acid analog in the four-vessel occlusion model of ischemia. **Eur. J. Pharmacol.**, v.667, n.1-3, p.182-187, 2011.

GLEADLE, J.M.; MAZZONE, A. Remote ischaemic preconditioning: closer to the mechanism? **F1000Res.**, v.5, p.2846, 2016.

GONZÁLEZ, A.; VARO, N.; ALEGRE, E.; DÍAZ, A.; MELERO, I. Immunosuppression routed via the kynurenine pathway: a biochemical and pathophysiological approach. **Adv. Clin. Chem.**, v.45, p.155-197, 2008.

JOHNSON, C.H.; IVANISEVIC, J.; SIUZDAK, G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v.17, n.7, p.451-459, 2016.

KANO, H.; TOYAMA, Y.; IMAI, S.; IWAHASHI, Y.; MASE, Y.; YOKOGAWA, M.; OSAWA, M.; SHIMADA, I. Structural mechanism underlying G protein family-specific regulation of G protein-gated inwardly rectifying potassium channel. **Nat Commun**, v.10, n.1, p.2008, 2019.

KIM, J. Spermidine is protective against kidney ischemia and reperfusion injury through inhibiting DNA nitration and PARP1 activation. **Anat. Cell Biol.**, v.50, n.3, p.200-206, 2017.

LEE, H.J.; SUH, J.K.; SONG, H.H.; JEONG, M.A.; YEOM, J.H.; KIM, D.W. Antioxidant effects of methylprednisolone and hydrocortisone on the impairment of endothelium dependent relaxation induced by reactive oxygen species in rabbit abdominal aorta. **Korean J. Anesthesiol.**, v.64, n.1, p.54-60, 2013.

LELOUP, A.J.A.; VAN HOVE, C.E.; DE MOUDT, S.; DE MEYER, G.R.Y.; DE KEULENAER, G.W.; FRANSEN, P. Vascular smooth muscle cell contraction and relaxation in the isolated aorta: a critical regulator of large artery compliance. **Physiol. Rep.**, v.7, n.4, p.e13934, 2019.

LUGO-HUITRÓN, R.; BLANCO-AYALA, T.; UGALDE-MUÑIZ, P.; CARRILLO-MORA, P.; PEDRAZA-CHAVERRÍ, J.; SILVA-ADAYA, D.; MALDONADO, P.D.; TORRES, I.; PINZÓN, E.; ORTIZ-ISLAS, E.; LÓPEZ, T.; GARCÍA, E.; PINEDA, B.; TORRES-RAMOS, M.; SANTAMARÍA, A.; LA CRUZ, V.P. On the antioxidant properties of kynurenic acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. **Neurotoxicol. Teratol.**, v.33, n.5, p.538-547, 2011.

MAFFEI, F.H.A.; YOSHIDA, W.B.; ROLLO, H.A.; MOURA, R.; SOBREIRA, M.L.; GIANNINI, M.; LASTÓRIA, S. **Doenças vasculares periféricas**. 4ed. São Paulo: Ed. Guanabara Koogan, 2008.

MAGALHÃES, F.J.; MENDONÇA, L.B.A.; REBOUÇAS, C.B.A.; LIMA, F.E.T.; CUSTÓDIO, I.L.; OLIVEIRA, S.C. Fatores de risco para doenças cardiovasculares em profissionais de enfermagem: estratégias de promoção da saúde. **Rev. Bras. Enferm.**, v.67, n.3, p.394-400, 2014.

MADEO, F.; EISENBERG, T.; PIETROCOLA, F.; KROEMER, G. Spermidine in health and disease. **Science**, v.359, n.6374, p.eaan2788, 2018.

MARCZIN, N.; EI-HABASHI, N.; HOARE, G.S.; BUNDY, R.E.; YACCOUB, M. Antioxidants in myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential and basic mechanisms. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.420, n.2, p.222-236, 2003.

MARIANO, D.O.; YAMAGUCHI, L.F.; JARED, C.; ANTONIAZZI, M.M.; SCIANI, J.M.; KATO, M.J.; PIMENTA, D.C. Pipa carvalhoi skin secretion profiling: absence of peptides and identification of kynurenic acid as the major constitutive component. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, v.167, p.1-6, 2015.

MURRY, C.E.; JENNINGS, R.B.; REIMER, K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. **Circulation**, v.74, n.5, p.1124-1136, 1986.

NISHIZUKA, Y.; HAYAISHI, O. Studies on the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide. I. Enzymic synthesis of niacin ribonucleotides from 3-hydroxyanthranilic acid in mammalian tissues. **J. Biol. Chem.**, v.238, p.3369-3377, 1963.

NOGUCHI, T.; MINATOGAWA, Y.; OKUNO, E.; NAKATANI, M.; MORIMOTO, M.; KIDO, R. Purification and characterization of kynurenine-2-oxoglutarate aminotransferase from the liver, brain and small intestine of rats. **Biochem. J.**, v.151, n.2, p.399-406, 1975.

OMER, K.; NERMIN, G.; ALI, A.; MEHMET, A.; UNAL, D.; SEZEN, K.S.; HAKAN, K. Tourniquet-induced ischaemia-reperfusion injury: the comparison of antioxidative effects of small-dose propofol and ketamine. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v.67, n.3, p.246-250, 2017.

PARADA-TURSKA, J.; RZESKI, W.; ZGRAJKA, W.; MAJDAN, M.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M.; TURSKI, W. Kynurenic acid, an endogenous constituent of rheumatoid arthritis synovial fluid, inhibits proliferation of synoviocytes in vitro. **Rheumatol. Int.**, v.26, n.5, p.422-426, 2006.

PEDERSEN, E.R.; TUSETH, N.; EUSSEN, S.J.; UELAND, P.M.; STRAND, E.; SVINGEN, G.F.; MIDTTUN, Ø.; MEYER, K.; MELLGREN, G.; ULVIK, A.; NORDREHAUG, J.E.; NILSEN, D.W.; NYGÅRD, O. Associations of plasma kynurenines with risk of acute myocardial infarction in patients with stable angina pectoris. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.35, n.2, p.455-462, 2015.

PEDRON, C.; VON RISTOW, A.; CURY FILHO, J.M.; MARTIN, H.S.; PEIXOTO, C.C.; FONSECA, L.M.B. Tratamento endovascular da oclusão das artérias ilíacas. **Radiol Bras.**, v. 34, n. 5, p. 261–265, 2001.

PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Prog. Neurobiol.**, v.64, n.1, p.51-68, 2001.

PUGSLEY, M.K.; TABRIZCHI, R. The vascular system. An overview of structure and function. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v.44, n.2, p.333-340, 2000.

ROCHA, B.C.; MENDES, R.R.; LIMA, G.V.; ALBUQUERQUE, G.S.; ARAÚJO, L.L.; DE JESUS, M.N.; DOS SANTOS, W.L.; CARREIRO, M.C. Experimental model of mesenteric ischemia: reperfusion by abdominal aorta clamping in Wistar rats. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v.39, n.3, p.207-210, 2012.

RODGERS, G.M. Hemostatic properties of normal and perturbed vascular cells. **FASEB J.**, v.2, n.2, p.116-123, 1988.

SANTOS, C.H.; GOMES, O.M.; PONTES, J.C.; MIJI, L.N.; BISPO, M.A. The ischemic preconditioning and postconditioning effect on the intestinal mucosa of rats undergoing mesenteric ischemia/reperfusion procedure. **Acta Cir. Bras.**, v.23, n.1, p.22-28, 2008.

SAS, K.; CSETE, K.; VÉCSEI, L.; PAPP, J.G. Effect of systemic administration of L-kynurenine on corticocerebral blood flow under normal and ischemic conditions of the brain in conscious rabbits. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v.42, n.3, p.403-409, 2003.

SCHWARCZ, R.; FOSTER, A.C.; FRENCH, E.D.; WHETSELL JR, W.O.; KOHLER, C. Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. **Life Sci.**, v.35, n.1, p.19-32, 1984.

SHAJIB, M.S.; KHAN, W.I. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. **Acta Physiol (Oxf)**, v.213, n.3, p.561-574, 2015.

SHEPHERD J.T.; VANHOUTTE, P.M. **The human cardiovascular system: facts and concepts.** New York: Raven Press, 1979.

SILVA, A.S.; ZANESCO, A. Exercício físico, receptores  $\beta$ -adrenérgicos e resposta vascular. **J. Vasc. Bras.**, v. 9, n.2, p.47-56, 2010.

SOCESP. Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. **9 verdades e 1 mentira sobre doenças cardiovasculares.** Disponível em: <http://soces.org.br/noticias/cardiologia/9-verdades-e-1-mentira-sobre-doencas-cardiovasculares>. Acesso em: 01 nov. 2019.

SONG, Z.; WANG, H.; YIN, X.; DENG, P.; JIANG, W. Application of NMR metabolomics to search for human disease biomarkers in blood. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v.57, n.4, p.417-441, 2019.

STAZKA, J.; LUCHOWSKI, P.; WIELOSZ, M.; KLEINROK, Z.; URBANSKA, E.M. Endothelium-dependent production and liberation of kynurenic acid by rat aortic rings exposed to L-kynurenine. **Eur. J. Pharmacol.**, v.448, n.2-3, p.133-137, 2002.

STONE, T.W. Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. **Prog. Neurobiol.**, v.64, n.2, p.185-218, 2001.

TANDON, A.; BANNYKH, S.; KOWALCHYK, J.A.; BANERJEE, A.; MARTIN, T.F.; BALCH, W.E. Differential regulation of exocytosis by calcium and CAPS in semi-intact synaptosomes. **Neuron**, v. 21, n.1, p.147-154, 1998.

TASK FORCE MEMBERS; STEG, P.G.; JAMES, S.K.; ATAR, D.; BADANO, L.P.; BLÖMSTROM-LUNDQVIST, C.; BORGER, M.A.; DI MARIO, C.; DICKSTEIN, K.; DUCROCQ, G.; FERNANDEZ-AVILES, F.; GERSHLICK, A.H.; GIANNUZZI, P.; HALVORSEN, S.; HUBER, K.; JUNI, P.; KASTRATI, A.; KNUUTI, J.; LENZEN, M.J.; MAHAFFEY, K.W.; VALGIMIGLI, M.; VAN 'T HOF, A.; WIDIMSKY, P.; ZAHGER, D. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. **Eur. Heart J.**, v.33, n.20, p.2569-2619, 2012.

TENNANT, M.; MCGEACHIE, J.K. Blood vessel structure and function: a brief update on recent advances. **Aust. N. Z. J. Surg.**, v.60, n.10, p.747-753, 1990.

THYGESEN, K.; ALPERT, J.S.; JAFFE, A.S.; CHAITMAN, B.R.; BAX, J.J.; MORROW, D.A.; WHITE, H.D.; EXECUTIVE GROUP ON BEHALF OF THE JOINT EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY (ESC)/AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY (ACC)/AMERICAN HEART ASSOCIATION (AHA)/WORLD HEART FEDERATION (WHF) TASK FORCE FOR THE UNIVERSAL DEFINITION OF MYOCARDIAL INFARCTION. Fourth universal definition of myocardial infarction. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.72, n.18, p.2231-2264, 2018.

TURSKI, W.A.; NAKAMURA, M.; TODD, W.P.; CARPENTER, B.K.; WHETSELL JR, W.O.; SCHWARCZ, R. Identification and quantification of kynurenic acid in human brain tissue. **Brain Res.**, v.454, n.1-2, p.164-169, 1988.

URBAŃSKA, E.M.; LUCHOWSKI, P.; LUCHOWSKA, E.; PNIEWSKI, J.; WOŹNIAK, R.; CHODAKOWSKA-ZEBROWSKA, M.; LAZAREWICZ, J. Serum kynurenic acid positively correlates with cardiovascular disease risk factor, homocysteine: a study in stroke patients. **Pharmacol. Rep.**, v.58, n.4, p.507-511, 2006.

VÉCSEI, L.; SZALÁRDY, L.; FÜLÖP, F.; TOLDI, J. Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.12, n.1, p.64-82, 2013.

WANG, Y.; LIU, H.; MCKENZIE, G.; WITTING, P.K.; STASCH, J.P.; HAHN, M.; CHANGSIRIVATHANATHAMRONG, D.; WU, B.J.; BALL, H.J.; THOMAS, S.R.; KAPOOR, V.; CELERMAJER, D.S.; MELLOR, A.L.; KEANEY JR, J.F.; HUNT, N.H.; STOCKER, R. Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. **Nat. Med.**, v.16, n.3, p.279-285, 2010.

YAMAKI, I.N.; PONTES, R.V.; COSTA, F.L.; YAMAKI, V.N.; TEIXEIRA, R.K.; YASOJIMA, E.Y.; BRITO, M.V.. Kidney ischemia and reperfusion syndrome: effect of lidocaine and local postconditioning. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v.43, n.5, p.348-353, 2016.

YAMAMOTO, K.; LI, X.; SHU, C.; MIYATA, T.; DARDIK, A. Technical Aspects of the Mouse Aortocaval Fistula. **Jove Journal**, e50449, 2013.

YASSIN, M.M.; HARKIN, D.W.; BARROS D'SA, A.A.; HALLIDAY, M.I.; ROWLANDS, B.J. Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. **World J. Surg.**, v.26, n.1, p.115-221, 2002.

YOKOYAMA, M.; INOUE, N.; KAWASHIMA, S. Role of the vascular NADH/NADPH oxidase system in atherosclerosis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.902, p.241-247, 2000.

YU, E.; RUIZ-CANELA, M.; GUASCH-FERRÉ, M.; ZHENG, Y.; TOLEDO, E.; CLISH, C.B.; SALAS-SALVADÓ, J.; LIANG, L.; WANG, D.D.; CORELLA, D.; FITÓ, M.; GÓMEZ-GRACIA, E.; LAPETRA, J.; ESTRUCH, R.; ROS, E.; COFÁN, M.; ARÓS, F.; ROMAGUERA, D.; SERRA-MAJEM, L.; SORLÍ, J.V.; HU, F.B.; MARTINEZ-GONZALEZ, M.A. Increases in plasma tryptophan are inversely associated with incident cardiovascular disease in the Prevención con Dieta Mediterránea (PREDIMED) study. **J. Nutr.**, v.147, n.3, p.314-322, 2017.

ZAMMERT, M.; GELMAN, S. The pathophysiology of aortic cross-clamping. **Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.**, v.30, n.3, p.257-269, 2016.

ZAPOLSKI, T.; KAMIŃSKA, A.; KOCKI, T.; WYSOKIŃSKI, A.; URBANSKA, E.M. Aortic stiffness-Is kynurenic acid a novel marker? Cross-sectional study in patients with persistent atrial fibrillation. **PLoS One**, v.15, n.7, p.:e0236413, 2020.

ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P.M.; LEUNG, S.W. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **J. Pharmacol. Sci.**, v.129, n.2, p.83-94, 2015.

ZHU, Y.; XIAN, X.; WANG, Z.; BI, Y.; CHEN, Q.; HAN, X.; TANG, D.; CHEN, R. Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation. **Biomolecules**, v.8, n.3, p.80, 2018.

ZWILLING, D.; HUANG, S.Y.; SATHYASAIKUMAR, K.V.; NOTARANGELO, F.M.; GUIDETTI, P.; WU, H.Q.; LEE, J.; TRUONG, J.; ANDREWS-ZWILLING, Y.; HSIEH, E.W.; LOUIE, J.Y.; WU, T.; SCEARCE-LEVIE, K.; PATRICK, C.; ADAME, A.; GIORGINI, F.; MOUSSAOUI, S.; LAUE, G.; RASSOULPOUR, A.; FLIK, G.; HUANG, Y.; MUCHOWSKI, J.M.; MASLIAH, E.; SCHWARCZ, R.; MUCHOWSKI, P.J. Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration. **Cell**, v.145, n.6, p.863-874, 2011.