

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Bioquímica

**EFEITO *IN VITRO* DA HISTIDINA E
DERIVADOS SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO
EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS**

Claudia Machado Tansini

Orientador

Prof. Dr. Carlos Severo Dutra Filho

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas –
Bioquímica – como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica

Porto Alegre, 2003

Labor

Há um encanto no plantar
e uma alegria no colher.
Quando a semente é estéril,
aconchegá-la com as mãos,
sulcar o chão com os dedos,
cobri-la com a terra úmida
velando a vida extinta,
são no labor o justo encanto.

Quando a planta viceja
e os frutos adoçam o vento,
o sabor da colheita farta
é o suave e generoso vinho
que alegra o coração.

Mas a festa da colheita
prenuncia um novo plantio,
pois assim é o coração humano,
sempre buscando o amanhã.

Clóvis Milton Duval Wannmacher

Aos meus pais, pela vida, pela
educação, pelo exemplo, pelo amor e
incentivo incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao Dutra por ter me ensinado a trabalhar em ciência básica e por todos os outros ensinamentos, pela excelente orientação no sentido literal da palavra, pela confiança, paciência e pela amizade.

À professora Angela Wise pelos prazos e pelos bons fluídos.

Ao professor Moacir pela sensibilidade e por me dizer, que o que quer que fosse, iria passar, e realmente passou.

Ao Clóvis pelo biofu, pela amizade, pelas poesias, pelas longas conversas.

À Martine pela amizade, pelo apoio e por tudo que me ensinou.

À Carolina e Ângela pelas noções básicas no início do trabalho.

Aos bolsistas do laboratório 36, especialmente à Carla e a Karina, que passaram muitos finais de semana no laboratório comigo, sem as quais o trabalho teria sido mais difícil.

À Raquel pela ajuda com os cálculos de enzimas e pelas conversas.

À Renata pela acolhida e pela amizade.

Aos colegas do laboratório 38, sempre dispostos a ajudar.

Aos colegas do laboratório 34, principalmente ao Xuxa por todo tipo de ajuda.

À Vânia e à Cleide, pela amizade, pelos incentivos e pelos slides.

Aos funcionários do CEPEA que sempre atenderam aos meus pedidos.

À todos os meus amigos, por serem meus amigos e incentivadores.

À tia Anita e tio Rubens pelo meu Lenhinger e incentivos durante todo o trabalho.

À toda minha família que incentiva e sempre dá apoio moral.

RESUMO

A histidinemia é um erro inato do metabolismo causado pela deficiência da atividade da enzima histidase. Na histidinemia ocorre acúmulo de histidina e seus metabólitos, bem como deficiência de ácido urocânico. Pacientes sintomáticos apresentam, principalmente, defeitos na fala, retardo mental, porém alguns pacientes são assintomáticos. Alguns trabalhos na literatura atribuem à histidina um efeito oxidante, aumentando a lipoperoxidação e potencializando a toxicidade do peróxido de hidrogênio. Visto que a fisiopatologia dos sintomas neurológicos associados à histidinemia ainda não é bem entendida, nós resolvemos investigar os efeitos da histidina e alguns de seus derivados sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo. Observamos que a quimioluminescência aumenta e que os valores de TRAP foram reduzidos na presença de histidina *in vitro*. Vimos também, que a histidina, nas concentrações testadas, não altera o TBA-RS assim como não altera a atividade da catalase, glutaciona peroxidase e superóxido dismutase. Resultados semelhantes foram obtidos com o ácido imidazolacético na quimioluminescência e no TRAP, porém nas enzimas antioxidantes, observamos que o ácido imidazolacético diminui a atividade da catalase. As medidas de TBA-RS e as atividades da superóxido dismutase e glutaciona peroxidase não foram alteradas pelo ácido. O ácido imidazolático varia o comportamento conforme a concentração utilizada: em concentrações mais baixas na quimioluminescência mostra efeito oxidante, porém nas concentrações mais altas mostra efeito antioxidante nas técnicas de quimioluminescência e TBA-RS e aumenta a atividade da superóxido dismutase. Este ácido não altera o TRAP, assim como as atividades da catalase e glutaciona peroxidase. Nossos resultados sugerem que a histidina *in vitro* induz estresse oxidativo em concentrações acima de 2,5 mM. Se os efeitos apresentados neste trabalho estão envolvidos na fisiopatologia cerebral de pacientes histidinêmicos sintomáticos é uma questão que permanece ainda em aberto. Portanto, mais estudos são necessários para melhor caracterizar o papel de histidina e seus metabólitos sobre estresse oxidativo no sistema nervoso central, em especial na histidinemia.

ABSTRACT

Histidinemia is an inherited metabolic disorder caused by deficiency of histidase activity, which leads to tissue accumulation of histidine and its derivatives. Affected patients usually present speech delay and mental retardation, although asymptomatic patients have been reported. Considering that the pathophysiology of the neurological dysfunction of histidinemia is not yet understood and since histidine has been considered a pro-oxidant agent, in the present study we investigated the effect of histidine and its derivatives, imidazole-4-acetic acid and L- β -imidazolelactic acid, at concentrations ranging from 0.1 to 10 mM, on various parameters of oxidative stress in cerebral cortex of 30-day-old Wistar rats. Chemiluminescence, total radical-trapping antioxidant potential (TRAP), thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS), and the activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were measured in tissue homogenates in the presence of L-histidine or L- β -imidazolelactic acid. We observed that L-histidine provoked an increase of chemiluminescence and a reduction of TRAP at concentrations of 2.5 mM and higher, while TBA-RS measurement, GSH-Px, CAT and SOD activities were not affected. The imidazole-4-acetic acid provoked an increase of chemiluminescence and a reduction of TRAP at concentrations of 5 mM and higher, decrease activity of CAT in a dose-dependent manner, while TBA-RS measurement, GSH-Px and SOD activities were not affected. Furthermore, L- β -imidazolelactic acid provoked antioxidant effects at high concentrations (5 to 10 mM) as observed by the reduction of chemiluminescence, although this compound enhanced chemiluminescence at low concentrations (0.5 to 1 mM). These results suggest that in vitro oxidative stress is elicited by histidine but only at supraphysiological concentrations.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
I – INTRODUÇÃO.....	1
I.1. Erros Inatos do Metabolismo.....	2
I.2 – Histidinemia	3
I.2.1 - Definição	3
I.2.2 - Histórico e Frequência	4
I.2.3 - Metabolismo da Histidina.....	5
I.2.4 - Histidase	6
I.2.5 - Manifestações Clínicas.....	6
I.2.6 - Alterações Bioquímicas	7
I.2.7 – Diagnóstico	8
I.2.8 – Tratamento.....	8
I.3 - Radicais Livres.....	9
I.3.1 Definições e Generalidades	9
I.3.2 Sistemas de Defesa Antioxidante.....	12
I.3.3 - Estresse Oxidativo	15
I.3.4 - Radicais Livres e Sistema Nervoso Central	16
I.4 – Efeitos Tóxicos da Histidina	17
I.5 – Ácido Imidazolacético e seus Efeitos Neurofarmacológicos.....	18
II. OBJETIVOS.....	19
III. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	21
Effects of Histidine and Imidazolelactic Acid on Various Parameters of the Oxidative Stress in Cerebral Cortex of Young Rats	22

Imidazole-4-acetic Acid Stimulates In Vitro Oxidative Stress in Cerebral Cortex of Young Rats.....	46
---	-----------

IV. DISCUSSÃO.....	76
V. CONCLUSÃO	83
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
VI. ANEXOS	101

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1: Rota de degradação da histidina (Stifel e Herman, 1971).....	5
Figura I.2: Geração de radical livre.....	9
Figura I.3: Redução do O ₂ a H ₂ O.	11
Figura I.4: Ação dos antioxidantes.	13
Figura I.5: Estresse Oxidativo.	15
Figura VII.1 Efeito da carnosina sobre o TRAP em homogeneizado de córtex cerebral de ratos	103
Figura VII.2 Efeito da carnosina sobre a quimioluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos	104
Figura VII.3 Efeito da carnosina sobre as TBA-RS em homogeneizado de córtex cerebral de ratos	105

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT	Catalase
Cu⁺	Cobre
CuZn-SOD	Cobre-zinco Superóxido Dismutase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EAO	Espécie Ativa de Oxigênio
EO	Estresse oxidativo
Fe²⁺	Íon Ferroso
Fe³⁺	Íon Férrico
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GSH	Glutaciona Reduzida
GSH-Px	Glutaciona Peroxidase
GSSG	Glutaciona Oxidada
H⁺	Íon Hidrogênio
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HO₂[·]	Radical Peroxil
IAA	Ácido Imidazolacético
LOOH	Lipoperóxido
Mn-SOD	Manganês Superóxido Dismutase
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (forma reduzida)
NO[·]	Óxido Nítrico
O₂	Oxigênio molecular
O₂^{-·}	Ânion Superóxido
OH[·]	Radical Hidroxil
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
TRAP	Potencial Antioxidante Total
TBA-RS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

I – INTRODUÇÃO

I.1. Erros Inatos do Metabolismo

A história da genética bioquímica humana começou no início do século 20, quando Garrod iniciou o estudo sobre alcaptonúria. Garrod observou que a alcaptonúria tinha uma distribuição familiar, onde freqüentemente um ou mais irmãos estavam envolvidos, e que havia uma alta incidência de casamentos consangüíneos entre os pais de seus pacientes. Em conferência com Bateson, Garrod entendeu que essas observações podiam ser explicadas como defeitos inatos, uma condição recessiva, expressão descoberta recentemente pelas leis de Mendel.

De suas observações de pacientes com alcaptonúria, albinismo, cistinúria e pentosúria, Garrod desenvolveu o conceito de que certas doenças surgem quando uma enzima, que governa um simples passo metabólico, está reduzida ou ausente. Em torno de 40 anos depois dessa descoberta de Garrod, surgiu o conceito de "um gen - uma enzima" proposto por Beadle e Tatum. O conceito um gen – uma enzima é descrito por Tatum como segue:

- a) todos os processos bioquímicos em todos os organismos estão sobre controle genético;
- b) esses processos bioquímicos estão envolvidos dentro de uma série de reações individuais;
- c) cada reação bioquímica está sob controle de um único gen diferente;
- d) mutações de um único gen resultam apenas em uma alteração na habilidade da célula em carrear uma simples reação química primária.

Este conceito, um gen – uma enzima, explicava potencialmente os erros inatos do metabolismo descritos por Garrod.

O conceito de doença molecular foi descrito em 1949 por Pauling e colaboradores, quando surgiram evidências diretas de que mutações produzem alterações na estrutura primária de proteínas. Pauling mostrou que a hemoglobina falcêmica migrava diferentemente da hemoglobina normal em um campo elétrico. Estudos posteriores de Ingram estabeleceram que a anormalidade eletroforética aparece porque a hemoglobina falcêmica tinha um resíduo de valina substituindo um resíduo de ácido glutâmico em um ponto da seqüência de aminoácidos. Essa constatação fecha uma era de descobertas em genética bioquímica humana: erros inatos do metabolismo são causados por mutações gênicas que produzem proteínas anormais, nas quais a atividade funcional está alterada (Beaudet et al., 1995).

I.2 – Histidinemia

I.2.1 - Definição

Histidinemia é um erro inato do metabolismo causado pela deficiência da atividade da enzima histidase, principal rota de degradação da histidina, que degrada histidina a ácido urocânico. Na histidinemia ocorre acúmulo de histidina e seus metabólitos, bem como deficiência de ácido urocânico.

I.2.2 - Histórico e Freqüência

A histidinemia é uma das mais freqüentes e bem conhecidas desordem do metabolismo da histidina, sendo transmitida por herança autossômica recessiva. Em geral, sua freqüência é de aproximadamente 1:12.000, porém no Japão a freqüência é particularmente mais alta (1:9.600).

Descrita primeiramente em duas irmãs por Ghadimi e colaboradores em 1961, quando encontraram um falso-positivo para o teste do cloreto férrico (que diagnostica fenilcetonúria). Porém, investigando aminoácidos através de cromatografia, os níveis de fenilalanina encontravam-se normais na urina. No entanto, foi encontrado aumento das concentrações de histidina no sangue e na urina. Uma das irmãs apresentava defeito na fala, o que levou à suspeita de que a histidinemia poderia levar a anormalidades clínicas. A coloração verde encontrada no teste foi atribuída à presença de um metabólito da histidina, o ácido imidazolpirúvico, na urina (Auerbach et al., 1962). O defeito enzimático foi identificado por La Du et al. (1962) em extratos de pele de duas irmãs histidinêmicas não sendo observada atividade da enzima histidase, enquanto que a atividade era facilmente demonstrada em tecido similar de adultos e crianças não histidinêmicos.

I.2.3 - Metabolismo da Histidina

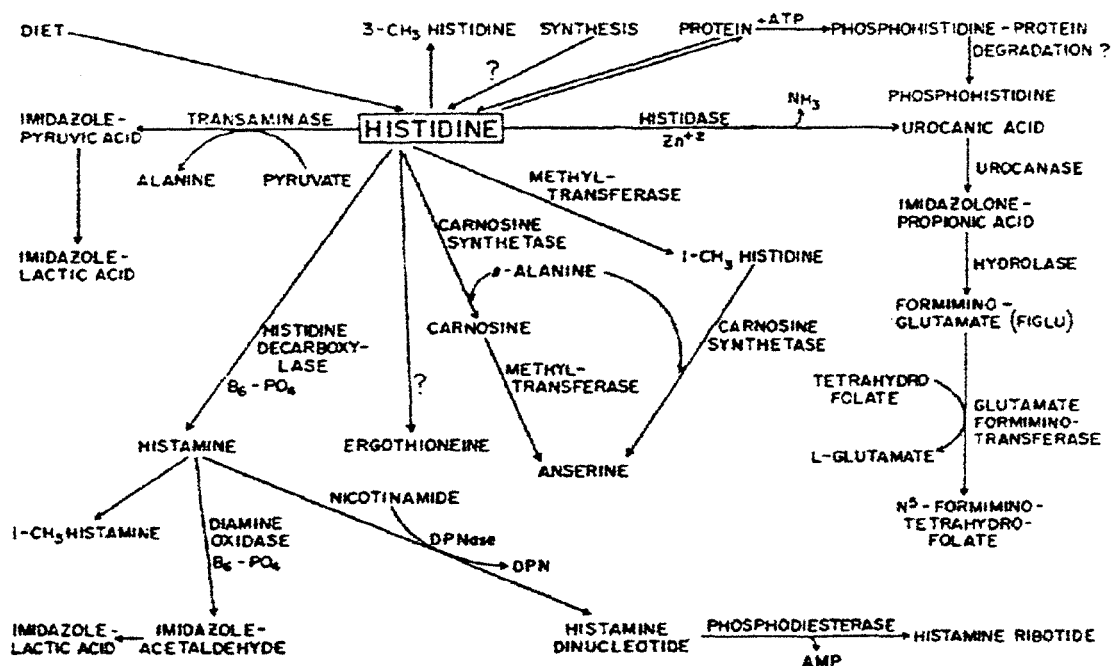


FIG. 1. Metabolic pathways of histidine.

Figura I.1 – Rota de degradação da histidina (Stifel e Herman, 1971).

A histidina é degradada por várias rotas, as quais dão origem a diversos metabólitos importantes:

- desaminação catalisada pela histidase para formar ácido urocânico, que após duas reações adicionais é convertido a ácido formiminoglutâmico (FIGLU);
- transaminação ou desaminação da histidina a ácido imidazolpirúvico, que por redução dá origem ao ácido imidazolacético e ácido imidazolático;
- descarboxilação da histidina em histamina que, por sua vez, é oxidada primeiro a imidazolacetaldeído e depois gerando ácido imidazolacético;
- metilação da histidina para formar 1-metil-histidina ou 3-metil-histidina;
- condensação da histidina ou 1-metil-histidina com beta-alanina para formar carnosina ou anserina, respectivamente (Stifel e Herman, 1971).

I.2.4 - Histidase

A causa da histidinemia é a deficiência da atividade da enzima histidase. A histidase é expressa principalmente no fígado, mas também é encontrada na pele, onde o ácido urocânico é um protetor natural contra raios ultra-violeta (UV), além de ser mediador do sistema de imunossupressão neste tecido. A deficiência da atividade da histidase ocorre tanto no fígado quanto na pele, porém há casos em que os pacientes apresentam atividade da histidase deficiente no fígado e normal ou próximo do normal na pele.

I.2.5 - Manifestações Clínicas

Embora muitos pacientes não apresentem sintomas, a manifestação clínica clássica da histidinemia são defeitos na fala, retardo mental ou inteligência abaixo do normal. Salienta-se, porém, que mesmo estes sinais clínicos não aparecem em todos os casos observados. (Levy et al., 2001).

Algumas anormalidades clínicas e somáticas isoladas têm sido relatadas associadas a histidinemia (Levy, 1989). Essas incluem ataxia cerebelar, hidrocefalia, distúrbios emocionais, baixa estatura, retardo no crescimento ósseo, desordens convulsivas, infecções recorrentes, puberdade precoce, anemia congênita hipoplástica, trombocitopenia púrpura idiopática e múltiplas anormalidades congênitas (Levy et al., 2001). Deve-se adicionar a esta lista um relato de um adulto histidinêmico mentalmente retardado com mioclonus progressivo (Duncan et al., 1991).

I.2.6 - Alterações Bioquímicas

A principal alteração bioquímica encontrada na histidinemia é o aumento de até doze vezes da concentração da histidina no sangue (Levy, 1989; Levy et al., 1974). Na urina, a histidina está marcadamente aumentada na histidinemia, refletindo o excesso dos níveis de histidina no sangue. Os valores relatados são de 2 a 6 mmol/dia, representando um aumento de seis a dez vezes acima do normal (Levy, 1995).

A histidina também é encontrada no líquido cefalorraquidiano. Wadman et al. (1967) encontraram em um paciente um valor aumentado dez vezes acima do normal com valores de 142 μM e 129 μM comparado com o valor normal de 13 μM (Levy et al., 1974). Shaw et al. (1963) relataram um valor de 48 μM em seus pacientes, uma elevação de três vezes acima do normal.

O ácido imidazolpirúvico não é normalmente detectado na urina, mas na histidinemia a excreção pode atingir 2 mmol/g de creatinina (Levy et al., 2001). As quantidades de outros metabólitos na urina de pacientes histidinêmicos, medida por Wadman et al. (1967) foram de: ácido imidazolático 0,4 a 5,0 mmol/g de creatinina; ácido imidazolacético 0,1 a 2,2 mmol/g de creatinina; e N-acetilhistidina 0,1 a 0,6 mmol/g de creatinina. Os valores para o ácido imidazolático e ácido imidazolacético são de cinco a cinqüenta vezes maiores do que o normal, enquanto N-acetilhistidina está aumentado de duas a cinco vezes (Wadman et al., 1971). Em contraste com sua presença na urina, esses metabólitos não são detectados no sangue, provavelmente por não serem capazes de sofrer reabsorção renal. Já foram relatados aumentos na excreção

urinária de metil-histidina e carnosina, mas não de homocarnosina e anserina (Ghadimi et al., 1962; Carton et al., 1970).

A princípio, todas as rotas alternativas da degradação da histidina incluindo transaminação, metilação, acetilação e descarboxilação, devem estar aumentadas na histidinemia (Tanabe e Sakura, 1989). Apesar disso, não se sabe o percentual específico de desvio da histidina para cada rota, e muito menos se no cérebro há aumento significativo das substâncias derivadas da histidina.

I.2.7 – Diagnóstico

O diagnóstico da histidinemia é feito através da identificação de níveis aumentados de histidina e de seus metabólitos no sangue e na urina. O ácido imidazolpirúvico é facilmente detectável pelo teste do cloreto férrico. Níveis de histidina no sangue encontrados na histidinemia são de 290 μM a 1420 μM (normal 70 a 120 μM), o que equivale a 4,5 a 22 mg/dl (normal 1,1 a 1,9 mg/dl). Os níveis tendem a ser mais elevados no primeiro ano de vida (Levy et al., 1974; Coulombe et al., 1983).

I.2.8 – Tratamento

O tratamento inicialmente utilizado nos pacientes histidinêmicos foi a restrição dietética de histidina (basicamente restrição protéica) de forma semelhante aos outros erros inatos do metabolismo de aminoácidos, como no caso da fenilcetonúria. Atualmente, a histidinemia é considerada um distúrbio

metabólico relativamente benigno visto que, em geral, considera-se que os pacientes histidinêmicos não requerem tratamento e que apenas uma pequena minoria se beneficiaria de medidas específicas para diminuir os níveis de histidina (Scriver e Levy, 1983).

1.3 - Radicais Livres

1.3.1 Definições e Generalidades

Radical livre é toda espécie química que é capaz de existir independentemente (por isso o termo livre) e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados (figura 2). Podem aparecer carregados ou não e possuindo uma reatividade variada (Halliwell e Gutteridge, 1986; Pryor, 1978). A molécula diatômica do oxigênio (O_2) é qualificada como um radical porque tem dois elétrons desemparelhados localizados em diferentes orbitais (Halliwell, 1992).

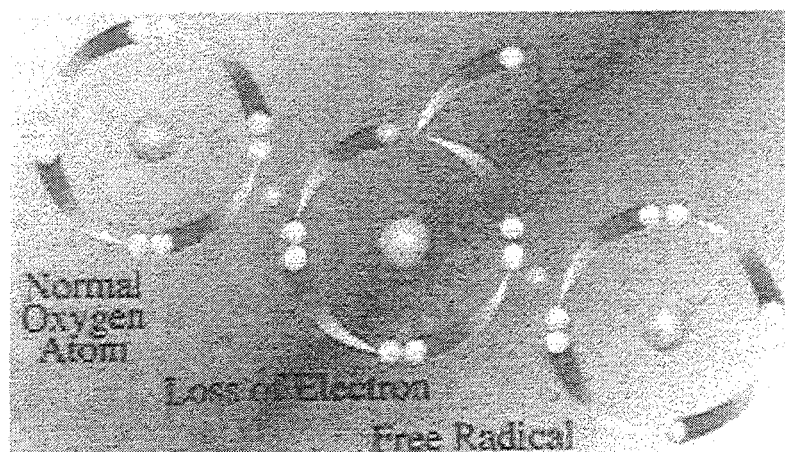


Figura I.2: Geração de radical livre.

O oxigênio é tanto essencial como tóxico para seres humanos. Esse paradoxo se deve pela estrutura eletrônica do O_2 , que possui dois elétrons desemparelhados com spin paralelos.

O oxigênio molecular, reage para formar espécies reduzidas de vida curta e altamente reativas como o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil (Halliwell, 2001).

As espécies ativas de oxigênio (EAO) fazem parte do metabolismo normal das células, são formadas em ambiente celular, principalmente na mitocôndria, na cadeia de transporte de elétrons e em reações de oxi-redução, que envolvem troca de elétrons, como a reação de Haber-Weiss e a reação de Fenton (Harman, 1956; Chance et al., 1979). São formadas por redução ou por excitação do oxigênio (oxigênio "singlet" ou singlete). Porém, existem EAO que não são radicais livres, como o peróxido de hidrogênio.

A redução total do oxigênio, leva uma molécula de O_2 a $2H_2O$ (figura 3). As reduções parciais do O_2 levam a formação de espécies ativas do oxigênio, que são: ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical peroxil e radical hidroxil. Na primeira redução "parcial" do oxigênio é formado o ânion superóxido $O_2^{\cdot-}$. Na segunda redução forma-se o radical hidroxil OH^{\cdot} . Após a formação do radical hidroxil, a próxima redução forma o radical peroxil HO_2^{\cdot} , e por último peróxido de hidrogênio H_2O_2 .

O ânion superóxido $O_2^{\cdot-}$ é produzido pela redução parcial do oxigênio, e pode gerar outras EAO. Este radical pode ser gerado por reações de autooxidação e reações enzimáticas. Várias enzimas tais como a xantina oxidase

geram radicais superóxido. Ele também pode ser produzido na cadeia de transporte de elétrons ao nível da ubiquinona ou do complexo da NADH desidrogenase. Este radical não atravessa livremente as membranas biológicas, penetrando nas células através de canais aniônicos (Oga, 1996).

Na próxima redução do oxigênio é formado o radical hidroxil $\text{OH}\cdot$. O radical hidroxil é a espécie mais ativa no ataque a moléculas biológicas. É produzido pelo peróxido de hidrogênio ou ânion superóxido na presença de metais de transição (Fe^{2+} e Cu^+) (Halliwell, 2001). O radical hidroxil é considerado a principal EAO responsável por iniciar a destruição de biomoléculas (Halliwell e Gutteridge, 1989). Pode atacar e prejudicar todas as principais biomoléculas, ou seja, carboidratos, lipídios, proteínas e DNA (Von Sonntag, 1987).

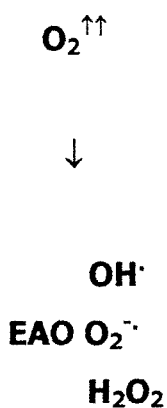
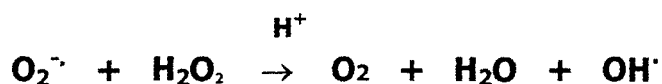


Figura I.3: Redução do O_2 a H_2O .

O_2 é um birradical. Ele tem uma tendência a formar outras espécies ativas de oxigênio (EAO) tóxicas, tais como radical hidroxil, superóxido e peróxido de hidrogênio.

Abaixo estão as reações que formam radical hidroxil:

Reação de Haber-Weiss



Reação de Fenton



O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical livre (é uma EAO), mas pode gerar radicais pela reação com metais de transição (ex. Fe^{2+}). O H_2O_2 é um agente oxidante fraco, porém oxida grupos tióis e alguns aminoácidos, podendo inativar enzimas (Oga, 1996). O H_2O_2 pode se difundir através das membranas.

Existem outros radicais livres que não são espécies ativas de oxigênio, como óxido nítrico NO^{\cdot} (Kostka, 1995). O NO^{\cdot} desempenha várias funções essenciais tais como vasoregulador e neurotransmissor (Honns et al., 1999; Bredt, 1999). Em excesso, pode inibir a citocromo oxidase levando ao escape de elétrons e formação de EAO pela redução parcial do O_2 (Forfia et al., 1999).

I.3.2 Sistemas de Defesa Antioxidante

Nosso organismo é protegido da ação de radicais livres – que produzem dano oxidativo – por vários antioxidantes com diferentes funções que agem de

forma independente (ex.: catalase), dependente (ex.: SOD que depende da catalase) e até mesmo sinergicamente (ex.: glutathiona peroxidase e glutathiona redutase).

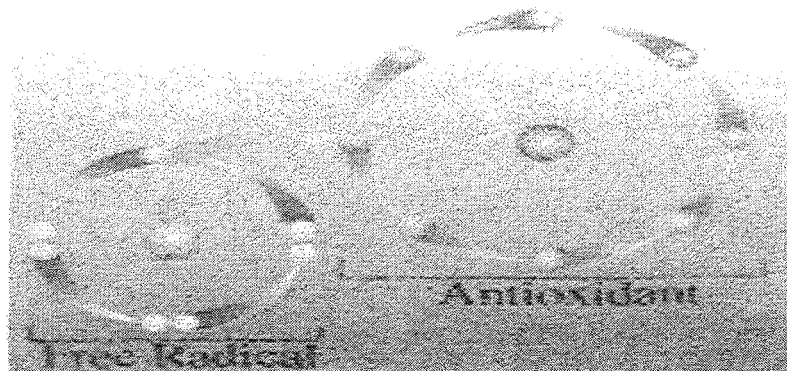


Figura I.4: Ação dos antioxidantes.

Os sistemas de defesa antioxidantes são classificados em três categorias por suas funções.

A primeira linha de defesa são os antioxidantes preventivos que suprimem a formação de radicais livres, dentre estas defesas estão as enzimas antioxidantes que são:

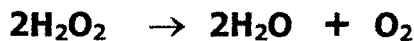
Superóxido Dismutase (SOD) – Identificada em 1969 por McCord e Fridovich, catalisa a dismutação do superóxido a peróxido de hidrogênio. Em seres humanos existem três formas de SOD (Cu,Zn-SOD citosólica, Mn-SOD mitocondrial e SOD extracelular), codificadas e reguladas independentemente (Fridovich, 1995).

Reação da SOD:



Catalase – É uma proteína que contém quatro grupos heme sendo específica para redução do peróxido de hidrogênio, não reduzindo peróxidos orgânicos. Esta enzima está localizada nos peroxissomos.

Reação da catalase:



Glutathione peroxidase (GSH-Px) – A GSH-Px é um tetrâmero contendo um átomo de selênio por subunidade. Reduz ácidos graxos, hidroperóxidos e peróxido de hidrogênio.

Reação da GSH-Px:



A segunda linha de defesa são os antioxidantes que “seqüestram” a atividade do radical para suprimir a reação de iniciação e/ou frear a cadeia de reações de propagação da lipoperoxidação. São vários os *scavengers* endógenos e são de duas classes: hidrofílicos e lipofílicos.

Hidrofílicos: vitamina C, ácido úrico, bilirrubina, albumina e tióis.

Lipofílicos: vitamina A, vitamina E e ubiquinol(forma reduzida da coenzima Q).

A terceira linha de defesa antioxidante é a de reparo. Fosfolipases reparam o dano oxidativo que o fosfolipídio tenha sofrido e suas atividades são aceitas por serem estimuladas pela oxidação. Entre outros, a fosfolipase A₂ tem recebido muita atenção por clivar seletivamente lipídios peroxidados das membranas, assim prevenindo o acúmulo de produtos tóxicos. As enzimas proteolíticas (proteínases, proteases e peptidases) presentes no citosol e

mitocôndrias de células mamíferas reconhecem, degradam e removem proteínas modificadas oxidativamente, prevenindo o acúmulo de proteínas oxidadas.

Vários dos sistemas de defesa antioxidante estão sujeitos a mecanismos de adaptação além de atuarem de forma dinâmica. Onde há sinal de produção e reação de radicais livres é induzida a formação e o transporte de antioxidantes para o local certo. É sabido que enzimas de defesa antioxidante são induzidas pelo estresse oxidativo (Niki,1993).

I.3.3 - Estresse Oxidativo

Estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de radicais livres e os mecanismos de defesa antioxidantes.

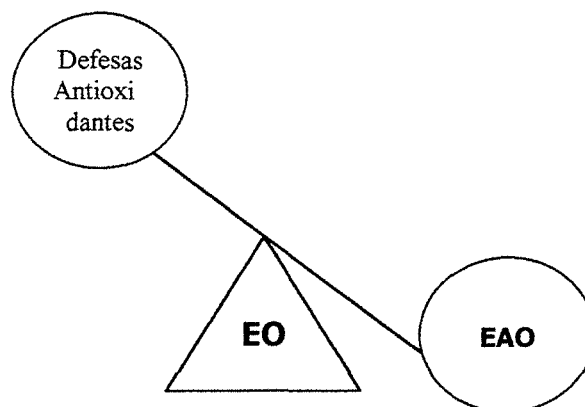


Figura I.5: Estresse Oxidativo.

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes e de prooxidantes, com predomínio de prooxidantes.

As três principais classes de macromoléculas biológicas que são suscetíveis ao ataque de radicais livres são os lipídios, os ácidos nucleicos e as proteínas, e há muitas evidências que todas sofrem dano oxidativo in vivo (Halliwell e Gutteridge, 1989).

O primeiro efeito da peroxidação lipídica é a diminuição da fluidez da membrana, o que altera suas propriedades e pode afetar significativamente proteínas ligadas à membrana (Tappel, 1975).

O dano oxidativo a ácidos nucleicos inclui além de adutos de bases e açúcares, quebra de fitas simples e duplas de DNA, e cross-links de outras moléculas (Dizdaroglu, 1993).

A oxidação de proteínas é bem menos caracterizada, mas muitos tipos de danos têm sido documentados, incluindo oxidação de grupos sulfidril, redução de dissulfetos, oxidação de resíduos de aminoácidos junto a sítio de metais-ligantes via oxidação catalisada por metais, reações com aldeídos, cross-linking proteína-proteína, e fragmentação peptídica (Starke-Reed e Oliver, 1989; Stadtman e Oliver, 1991).

I.3.4 - Radicais Livres e Sistema Nervoso Central

O sistema nervoso central como um todo é especialmente sensível aos danos causados por radicais livres por várias razões (Halliwell e Gutteridge, 1985; LeBel e Body, 1991). Primeiro, a membrana lipídica é muito rica em ácidos graxo poliinsaturados, que é especialmente sensível ao ataque de

radicais livres. Segundo, o cérebro tem pouca atividade da enzima catalase e tem apenas quantidades moderadas de SOD e glutathione peroxidase (Cohen, 1988). Terceiro, diversas áreas do cérebro (p. ex. "globus pallidus" e substância nigra) são ricos em ferro (Youdim, 1988^a; Youdim, 1988^b) e o líquido cefalorraquidiano não tem boa capacidade para ligar ferro, pois seu conteúdo de transferrina é muito baixo (Gruener et al., 1991). E quarto, o cérebro é um órgão metabolicamente muito ativo, o que pode ser evidenciado pelo fato de consumir mais de 20% do oxigênio total captado pelo organismo (Halliwell, 2001).

Várias doenças ou alterações patológicas que afetam o SNC têm sido estudadas nas quais os radicais livres podem estar envolvidos ou já tem sua participação definida. Entre elas destacam-se doença de Parkinson, doença de Alzheimer, acidentes vasculares cerebrais, convulsões, desordens acompanhadas de desmielinização, demência, síndrome de Down, choque e edema cerebral (Resnick & Parker, 1993).

I.4 – Efeitos Tóxicos da Histidina

Alguns efeitos tóxicos da histidina relacionados a EAO têm sido demonstrados. A histidina aumenta os efeitos clastogênicos do peróxido de hidrogênio em cromossomos e cromátide de fibroblastos embrionários humanos (Oya e Yamamoto, 1988). Também já foi relatado o estímulo da lipoperoxidação em retículo sarcoplasmático na presença de ferro (Erickson & Hultin, 1992) e o aumento da toxicidade do peróxido de hidrogênio sobre

células em cultura, levando à quebra de fitas duplas e simples de DNA e morte celular (Cantoni et al., 1994).

I.5 – Ácido Imidazolacético e seus Efeitos Neurofarmacológicos

O ácido imidazolacético (IAA) é um ligante de receptores GABA_A, GABA_C e imidazoline (Tunnicliff, 1998). Diversos efeitos neurofarmacológicos causados pela administração de IAA tais como analgesia, perda de reflexo e efeitos hipnóticos em camundongos e outras espécies têm sido relacionados com sua ação sobre os receptores de GABA (Roberts e Simonsen, 1966; Tunnicliff, 1998). Outros estudos mostram que o IAA provoca alterações eletroencefalográficas que sugerem excitação cortical. Essa combinação incomum de efeitos neurofisiológicos levou à hipótese de que o IAA poderia inibir seletivamente interneurônios inibitórios (Marcus et al. , 1971). Bovell et al. (1982) verificaram alterações no metabolismo cerebral causadas pela administração de IAA. Concentrações de intermediários glicolíticos e do ciclo do ácido cítrico encontram-se alteradas, tais como aumento de glicose e aspartato e redução de lactato, piruvato, malato, oxalacetato citrato e α -cetogluturato. Houve também aumento de fosfocreatina e diminuição de creatina e glutamato. Clifford et al. (1973) verificaram que o IAA provoca diminuição de glutamato e aumento de GABA, aumentando em 160% a proporção GABA/glutamato em cérebro de camundongos.

II. OBJETIVOS

Verificar o efeito *in vitro* da histidina, ácido imidazolacético e ácido imidazolático sobre parâmetros de estresse oxidativo – quimioluminescência, potencial antioxidante total (TRAP), medida de lipoperoxidação (TBA-RS) e sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

III. ARTIGOS CIENTÍFICOS

**Effects of histidine and imidazolelactic acid on various parameters of
the oxidative stress in cerebral cortex of young rats**

Submetido à International Journal of Developmental Neuroscience

Effects of histidine and imidazolelactic acid on various parameters of the oxidative stress in cerebral cortex of young rats

¹Tansini, C.M.; ¹Durigon, K.; ¹Testa, C.G.; ²Belló-Klein, A.; ¹Wajner, M.; ¹Wannmacher, C.M.D.; ¹Wyse, A.T.S.; and ¹Dutra-Filho, C.S.*

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

²Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Corresponding author:

Carlos Severo Dutra-Filho

Departamento de Bioquímica - ICBS
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo
90035-003 Porto Alegre RS
Brasil
Fax +55 51 3165535
Email: dutra@ufrgs.br

Running title: Histidine and oxidative stress

Key words: Histidine; Imidazolelactic acid; oxidative stress; rat brain

Abstract

Histidinemia is an inherited metabolic disorder caused by deficiency of histidase activity, which leads to tissue accumulation of histidine and its derivatives. Affected patients usually present speech delay and mental retardation, although asymptomatic patients have been reported. Considering that the pathophysiology of the neurological dysfunction of histidinemia is not yet understood and since histidine has been considered a pro-oxidant agent, in the present study we investigated the effect of histidine and one of its derivatives, L- β -imidazolelactic acid, at concentrations ranging from 0.1 to 10 mM, on various parameters of oxidative stress in cerebral cortex of 30-day-old Wistar rats. Chemiluminescence, total radical-trapping antioxidant potential (TRAP), thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS), and the activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were measured in tissue homogenates in the presence of L-histidine or L- β -imidazolelactic acid. We observed that L-histidine provoked an increase of chemiluminescence and a reduction of TRAP at concentrations of 2.5 mM and higher, while TBA-RS measurement, GSH-Px, CAT and SOD activities were not affected. Furthermore, L- β -imidazolelactic acid provoked antioxidant effects at high concentrations (5 to 10 mM) as observed by the reduction of chemiluminescence, although this compound enhanced chemiluminescence at low concentrations (0.5 to 1 mM). These results suggest that *in vitro* oxidative stress is elicited by histidine but only at supraphysiological concentrations.

Introduction

Histidine is found at high concentrations in biologic fluids and tissues of patients with histidinemia, an inborn error of metabolism caused by the deficiency of histidase activity, which is the main route of histidine utilization in humans. Some histidine derivatives also accumulate in the disorder, but to a lower levels. Histidinemia is considered a benign situation in most affected individuals, although, under certain circumstances, the disorder may be harmful to the central nervous system, as noted in the symptomatic histidinemic patients (Levy et al., 2001). Therefore, it seems of relevance to investigate in more details the mechanisms underlying histidine action and its possible toxicity to mammalian tissues.

In this context, it has been previously reported that L-histidine increases the toxicity of hydrogen peroxide (H_2O_2) in cultured mammalian cells (Tachon & Giacomoni, 1988), enhances the clastogenic action of hydrogen peroxide including the generation of chromosomal aberrations (Oya & Yamamoto, 1988), mediates the enhancement of hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and the formation of DNA double strand breakage (Cantoni et al., 1994a), and induces lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum (Erickson & Hultin, 1992). On the other hand, it has also been demonstrated antioxidant and protective effects of histidine on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP^+)-induced hydroxyl radical generation in the rat striatum (Obata & Yamanaka, 2000; Obata et al., 2001).

In the present study, we investigated the *in vitro* effect of histidine and L- β -imidazolelactic acid, a derivative of histidine, on various parameters of oxidative stress namely chemiluminescence, thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS), total radical-trapping potential (TRAP) as well as on the activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities in the brain of 30-day-old rats.

Materials and Methods

Reagents and equipment

All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA. Solutions were prepared using ultra pure grade water. L-Histidine-hydrochloride monohydrate and L- β -imidazolelactic acid were prepared on the day of the experiments in the incubation medium used for each technique and the pH adjusted to 7.4 when necessary. Chemiluminescence and TRAP were assayed using a beta scintillation spectrometer (Packard Tricarb 2100TR and Wallac model 1409, respectively), the enzyme activities were measured with a double-beam spectrophotometer with temperature control (Hitachi U-2001) and the TBA-RS were assayed using a Beckman DU 640 spectrophotometer.

Animals

Thirty-day-old Wistar rats bred in the Department of Biochemistry, UFRGS, were used. The dams had free access to water and to a standard commercial chow (Germani, Porto Alegre, RS, Brazil) containing 20.5% protein (predominantly soybean), 54% carbohydrate, 4.5% fiber, 4% lipids, 7% ash and 10% moisture. Temperature was maintained at $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$, with a 12-12h light/dark cycle. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for animal research of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, and followed the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications 80-23, revised 1996).

Tissue preparation

On the day of the experiments, animals were killed by decapitation without anesthesia and the brain was immediately removed. Tissue was kept chilled during all procedure. The olfactory bulbs and pons/medulla were discarded and the cerebral cortex was isolated and weighed. Tissue was homogenized in the incubation medium used for each technique and centrifuged at 1,000 g for 10 minutes at 4°C , and the supernatant was immediately used for the measurements.

In vitro experiments

Tissue homogenates were incubated for 1 hour at 37 °C on the presence of L-histidine or L-β-imidazolelactic acid. Controls were incubated with medium only. The final concentration of each substance in the incubation medium ranged from 1 to 10 mM, except for L-β-imidazolelactic acid, which was also incubated at concentrations ranged from 0.1 to 1 mM. After incubation, aliquots were taken to measure chemiluminescence, TBA-RS and TRAP. To test the action of histidine and derivatives on the enzymatic antioxidant defenses CAT, SOD and GSH-Px, the substances were added to the incubation medium used to assay each enzyme activity without previous incubation with tissue homogenate.

TBA-RS assay

Measurement of TBA-RS was performed according to Esterbauer and Cheeseman 1990. Briefly, the tissue sample is mixed with two volumes of cold 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) to precipitate protein. The precipitate is pelleted by centrifugation (10 minutes at 1,000 g) and an aliquot of the supernatant is added to equal volume of 0,67% (w/v) TBA in a boiling water bath for 15 min. A standard curve is prepared using malondialdehyde bisdiethylacetal as the source of malondialdehyde (MDA). After cooling the absorbance is read at 532 nm. TBA-RS were represented as nmol TBA-RS per mg protein.

Chemiluminescence assay

Samples were assayed for chemiluminescence in a dark room by the method of Gonzalez-Flecha et al. 1991. Incubation flasks contained 3.5 ml of medium consisting of 20 mM sodium phosphate, pH 7.4, and 140 mM KCl. The background chemiluminescence was measured and 0.5 ml of homogenates immediately added. Chemiluminescence was measured for 10 minutes at room temperature. The background chemiluminescence was subtracted from the total value and results are represented as cps per mg protein.

TRAP assay

TRAP was measured according the method described by Lissi et al. 1992. TRAP represents the total antioxidant capacity of the tissue and was determined by measuring the luminol chemiluminescence intensity induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) (ABAP) at room temperature. Four ml of 10 mM ABAP in 0.1 M glycine buffer pH 8.6 were then added to the vial and the background chemiluminescence was measured. Ten μ l of 4 mM luminol were then added and the chemiluminescence was measured. This was considered to be the initial value. Ten μ l of 80 μ M Trolox or homogenates was added and chemiluminescence was measured until it reached the initial levels. The addition of Trolox or tissue homogenate to the incubation medium reduces the chemiluminescence. The time necessary to return to the levels present before the addition was considered to be the induction time. The induction time is

directly proportional to the antioxidant capacity of the tissue and was compared to the induction time of Trolox. The results are reported as nmol of Trolox per mg protein.

Catalase assay

CAT activity was assayed by the method of Aebi 1984, which is based on the disappearance of H_2O_2 at 240 nm. One unit is defined as one μ mol of hydrogen peroxide consumed per minute and the specific activity reported as units per mg protein.

Superoxide dismutase assay

SOD activity was assayed by method of Marklund 1985. Cerebral tissue was homogenized 1:10 (w/v) in 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.2 containing 1 mM EDTA. This method is based on the pyrogallol autoxidation which is followed at 420 nm. The pyrogallol autoxidation is highly dependent on $O_2^{\cdot-}$ and is inhibited by the presence of SOD. One unit of SOD activity is defined as the amount of SOD that inhibits 50% the pyrogallol autoxidation. The specific activity is represented as units per mg protein.

Glutathione peroxidase assay

GSH-Px activity was measured by the method of Wendel 1981, except for the concentration of NADPH, which was adjusted to 0.1 mM after previous tests performed in our laboratory. Tissue homogenized 1:10 (w/v) in 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.7 plus EDTA. *Tert*-butyl-hydroperoxide was used as substrate. NADPH disappearance was monitored with a spectrophotometer at 340 nm. One GSH-Px unit is defined as one μmol of NADPH consumed per minute and specific activity is represented as units per mg protein.

Protein determination

Protein was measured by the method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance followed by Duncan multiple range test when the F value was significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer. P values less than 0.05 were considered to be significant.

Results

First, we tested the in vitro effect of L-histidine (1 to 10 mM) and L- β -imidazolelactic acid (0.1 to 10mM) on TRAP, chemiluminescence and TBA-RS (control values as mean \pm SEM: 29.52 \pm 3.02 nmol Trolox/mg protein, 1214 \pm 166 cps/mg protein and 0.99 \pm 0.03 nmol TBA-RS/mg protein, respectively).

Figure 1A shows that TRAP was significantly decreased by the presence of L-histidine in the homogenates at 2.5, 5 and 10 mM [F(4,40)=5.16; p <0.002]. In contrast, TRAP was not altered by L- β -imidazolelactic acid [F(4,25)=0.09; p >0.05] (Figure 1B).

Figure 2A shows that L-histidine stimulated chemiluminescence at concentrations of 5 and 10 mM [F(4,20)=2.82; p <0.05], whereas L- β -imidazolelactic acid caused the same effect at 0.5 and 1 mM [F(4,15)=4.31; p <0.01) and decreased chemiluminescence at high concentrations (5 and 10 mM) [F(4,20)=37.67; p <0.001] (Figure 2B).

Furthermore, the presence of L-histidine in the incubation medium (Figure 3A) did not alter TBA-RS at concentration up to 10 mM [F(4,20)=1.223; p >0.05]. However, a significant reduction of TBA-RS was obtained when 10 mM L- β -imidazolelactic acid was added to the incubation medium [F(4,35)=6.10; p <0.001] (Figure 3B).

Next, we tested the effect of L-histidine and L- β -imidazolelactic acid on the activity of the antioxidant enzymes CAT, SOD and GSH-Px (control values as mean \pm SEM: 5.80 \pm 0.36 U/mg protein, 23.27 \pm 1.97 U/mg protein and 19.20 \pm 1.08 U/mg protein, respectively). Table 1 shows that CAT [F(4,35)=0.79;

$p > 0.05$], SOD [$F(4,25)=1.69$; $p > 0.05$) and GSH-Px [$F(4,20)=2.54$; $p > 0.05$] activities were not altered in the presence of L-histidine. On the other hand, we observed an increase in the activity of SOD by 10 mM concentration of L- β -imidazolelactic acid [$F(4,20)=8.81$; $p < 0.001$], while GSH-Px [$F(4,20)=2.54$; $p > 0.05$] and CAT [$F(4,35)=0.75$; $p > 0.05$] activities were not altered by this organic acid (Table 2).

Discussion

Histidinemia is a frequent inherited metabolic disorder caused by deficient activity of histidase, first described by Ghadimi et al. in 1961. Although some patients affected by histidinemia are asymptomatic, a significant proportion of others present neurologic symptoms. However, the pathomechanisms involved in the brain injury in these patients are yet not established. In this context, we have previously demonstrated that histidine administration provokes learning deficits in rats (Dutra-Filho et al., 1989), suggesting that the amino acid probably provokes alterations in the brain leading to cognitive deficit.

Since oxidative stress is involved in the neuropathology of various neurodegenerative disorders, including Parkinson's disease, Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, and others (Halliwell, 2001) and considering that pro-oxidant properties have been demonstrated for histidine in various tissues but not in brain, in the present study we investigated the role of L-histidine on various parameters of oxidative stress in cerebral cortex of young rats.

In this context, it is well known that the brain is especially susceptible to oxidative damage because of its high O₂ consumption, highly polyunsaturated fatty acids and iron content, and its modest antioxidant defenses (Halliwell, 1999; Halliwell, 2001).

We first observed that L-histidine provokes an increase of chemiluminescence and a decrease of TRAP in cerebral cortex, while TBA-RS and the antioxidant enzyme activities were not affected by the amino acid. Considering that glutathione (GSH) is the major compound contributing to TRAP measurement in the brain, it is conceivable that the prominent reduction of TRAP by histidine may have resulted from reduced levels of GSH possibly secondary to increased free radical generation. Therefore, it is also feasible that reduction of the amount of its substrate GSH may contribute to reduced activity of GSH-Px.

Taken together that histidine increased chemiluminescence, a parameter of lipid peroxidation, and decreased TRAP, which refers the nonenzymatic antioxidant defences of a tissue, it can be presumed that high (supraphysiological) concentrations of histidine induces in vitro oxidative stress in cerebral cortex of rats, since this process is defined as the imbalance between free radical production and antioxidant defences.

Our data is in line with other studies showing a pro-oxidant effect of histidine (Oya & Yamamoto, 1988; Tachon & Giacomoni, 1989; Erickson & Hultin, 1992; Cantoni et al., 1994b; Oya-Ohta et al., 2001). In contrast, histidine seem to has protective antioxidant effects at very high concentrations

(25 mM and above) (Obata et al., 1999; Obata & Inada, 1999; Obata et al., 2000; Obata et al., 2001).

We also tested the effect of the histidine derivative L- β -imidazolelactic acid on the same parameters. We observed that L- β -imidazolelactic acid, at the high concentrations (5 to 10 mM), provoked a marked antioxidant effect, as observed by the reduction of chemiluminescence and TBA-RS, and by the increase of SOD activity. However, at low concentrations (0.5 and 1 mM), the acid provoked the opposite effect, stimulating chemiluminescence, as occurred with L-histidine.

Considering that the levels of L-histidine and L- β -imidazolelactic acid in histidinemic patients are below the concentrations which provoked in vitro stimulation of oxidative stress, at present it is difficult to presume the involvement of oxidative stress as an underlying mechanism responsible for the neurological findings observed in some patients affected by histidinemia.

Further in vitro and in vivo studies are however needed in order to characterize the role of histidine and its metabolites on oxidative stress in brain. Similarly, erythrocytes and plasma of histidinemic patients should be tested for oxidative stress. In case positive results are achieved, the use of antioxidants as a therapy strategy to prevent neurological symptoms should be tried in these patients.

Acknowledgements

This research was supported by grants from the Excellence Nuclei Program (PRONEX), PROPESQ/UFRGS and Brazilian National Research Council (CNPq).

References

Aebi H., (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105, 121-126.

Cantoni O., Guidarelli A., Sestili P., Giacomoni P.U. and Cattabeni F., (1994) L-Histidine-mediated enhancement of hydrogen peroxide-induced cytotoxicity: relationships between DNA single/double strand breakage and cell killing. *Pharmacological Research* 29, 169-178.

Cantoni O., Sestili P., Brandi G. and Cattabeni F., (1994) L-Histidine-mediated enhancement of hydrogen peroxide-induced cytotoxicity is a general response in cultured mammalian cell lines and is always associated with the formation of DNA double strand breaks. *FEBS Letters* 353, 75-78.

Dutra-Filho C.S., Wannmacher C.M.D., Pires R.F., Gus G., Kalil A.M. and Wajner M., (1989) Reduced locomotor activity of rats under histidine administration. *Journal of Nutrition* 119, 1223-1227.

Erickson M.C. and Hultin H.O., (1992) Influence of histidine on lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 292, 427-432.

Esterbauer H. and Cheeseman K.H., (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology* 186, 407-421.

Ghadimi H., Partington M.W. and Hunter A., (1961) A familial disturbance of histidine metabolism. *New England Journal of Medicine* 265, 221-224.

Gonzalez-Flecha B., Llesuy S. and Boveris A., (1991) Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Radical Biology & Medicine* 10, 93-100.

Halliwel B., (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases, therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & Aging* 18, 685-716.

Levy, H.L., Taylor, R.G. and McInnes, R.R. (2001). Disorders of histidine metabolism. In *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*, Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. and Valle, D. (eds) 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 1807-1820.

Lissi E., Pascual C. and Del Castillo M.D., (1992) Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radical Research Communications* 17, 299-311.

Lowry O.H., Rosebrough N. J., Farr A.L. and Randall R.J., (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-267.

Marklund, S.L. (1985). Pyrogallol Autoxidation. In *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton pp. 243-247.

Obata T., Aomine M. and Yamanaka Y., (1999) Protective effect of histidine on iron (II)-induced hydroxyl radical generation in rat hearts. *Journal of Physiology* 93, 213-218.

Obata T. and Inada T., (1999) Protective effect of histidine on MPP⁺-induced hydroxyl radical generation in rat striatum. *Brain Research* 817, 206-208.

Obata T. and Yamanaka Y., (2000) Protective effect of histidine on potassium depolarization enhances 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced hydroxyl radical generation in the rat striatum. *Life Sciences* 68, 689-697.

Obata T., Kubota S. and Yamanaka Y., (2001) Protective effect of histidine on para-nonylphenol-enhanced hydroxyl free radical generation induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) in rat striatum. *Biochimica et Biophysica Acta* 1568, 171-175.

Oya Y. and Yamamoto K., (1988) The biological activity of hydrogen peroxide. IV. Enhancement of its clastogenic actions by coadministration of L-histidine. Mutation Research 198, 233-240.

Oya-Ohta Y., Ueda A., Ochi T., Harada M. and Yamamoto K., (2001) The biological activity of hydrogen peroxide VII. L-Histidine increases incorporation of H₂O₂ into cells and enhances formation of 8-oxodeoxyguanosine by UV-C plus H₂O₂ but not H₂O₂ alone. Mutation Research 478, 119-127.

Tachon P. and Giacomoni P.U., (1989) Histidine modulates the clastogenic effect of oxidative stress. Mutation Research 211, 103-109.

Tachon P. and Giacomoni P.U., (1988) L-Histidine is a clastogenic factor. In Light in biology and medicine, Douglas, R.H., Moan, J., Dall'Acqua, F., (eds), Plenum, New York pp. 211-217.

Wendel A. (1981) Glutathione Peroxidase. Methods in Enzymology 77, 325-332.

Table 1. In vitro effect of histidine on antioxidant enzyme activities in cerebral cortex homogenates from young rats.

	L-Histidine concentration (mM)			
	1	2.5	5	10
CAT	98.6 ± 6.8	96.1 ± 5.6	89.8 ± 5.5	89.1 ± 4.9
GSH-Px	97.8 ± 9.4	84.3 ± 12.5	82.2 ± 14.3	70.1 ± 16.3
SOD	99.2 ± 15.2	105.2 ± 7.4	114.2 ± 5.0	125.1 ± 1.2

Results are mean ± S.E.M. (n=6 to 8) expressed in % of controls for experiments performed in duplicate. No significant differences were observed (ANOVA). CAT=catalase; GSH-Px=glutathione peroxidase; SOD=superoxide dismutase.

Table 2. In vitro effect of L-β-imidazolelactic acid on antioxidant enzyme activities in cerebral cortex homogenates from young rats.

	L-β-Imidazolelactic acid concentration (mM)			
	1	2.5	5	10
CAT	99.2 ± 12.7	119.5 ± 14.4	101.1 ± 11.3	123.7 ± 12.6
GSH-Px	89.2 ± 10.3	78.4 ± 4.3	75.7 ± 6.5	69.9 ± 8.0
SOD	89.0 ± 5.4	84.5 ± 6.8	113.9 ± 5.9	126.7 ± 4.7 **

Results are mean ± S.E.M. (n=5 to 8) expressed in % of controls for experiments performed in duplicate. ** Significantly different from the control, P<0.01 (Duncan multiple rang test). CAT=catalase; GSH-Px=glutathione peroxidase; SOD=superoxide dismutase.

Figure Legends

Figure 1. Effect of L-histidine (A) and L- β -imidazolelactic acid (B) on total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) in cerebral cortex of young rats. Results are means \pm S.E.M. (4 to 9 rats) expressed in % of controls for experiments performed in duplicate. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ significantly different from controls (Duncan multiple range test).

Figure 2. Effect of L-histidine (A) and L- β -imidazolelactic acid (B) on chemiluminescence in cerebral cortex of young rats. Results are means \pm S.E.M. (4 to 9 rats) expressed in % of controls for experiments performed in duplicate. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ significantly different from controls (Duncan multiple range test).

Figure 3. Effect of L-histidine (A) and L- β -imidazolelactic acid (B) on thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) in cerebral cortex of young rats. Results are means \pm S.E.M. (4 to 9 rats) expressed in % of controls for experiments performed in duplicate. ** $p < 0.01$ significantly different from controls (Duncan multiple range test).

FIGURE 1

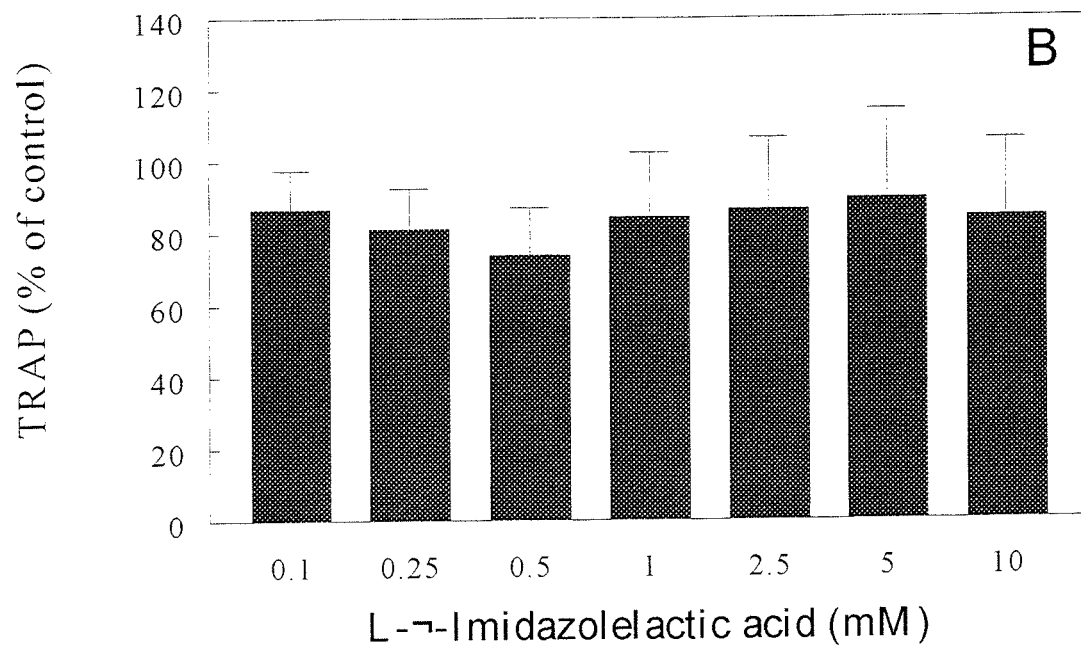
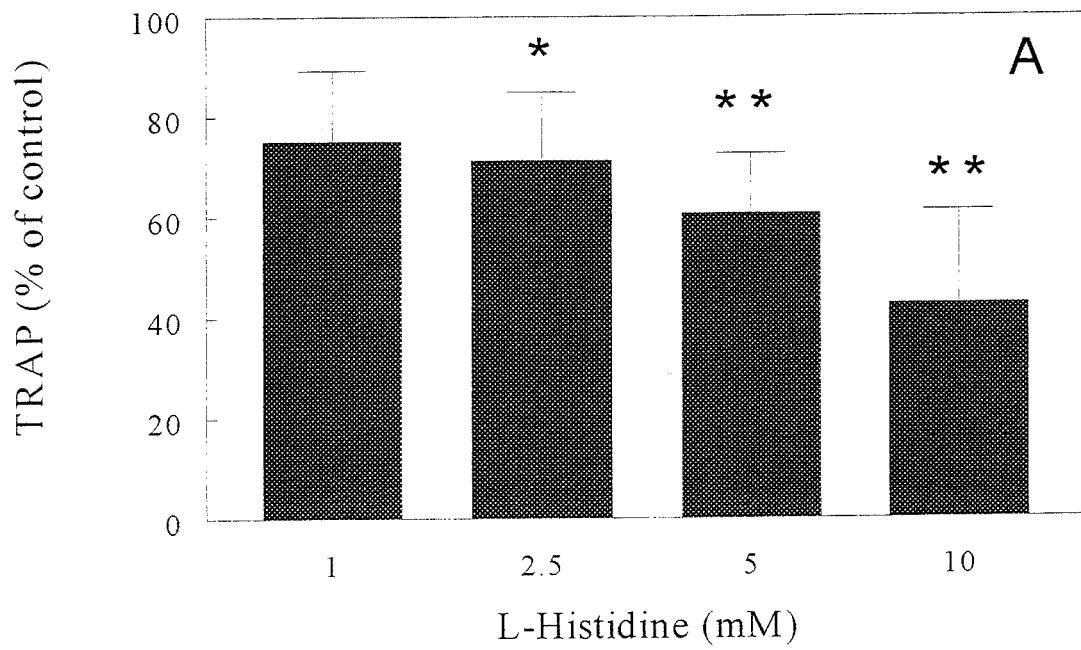


FIGURE 2

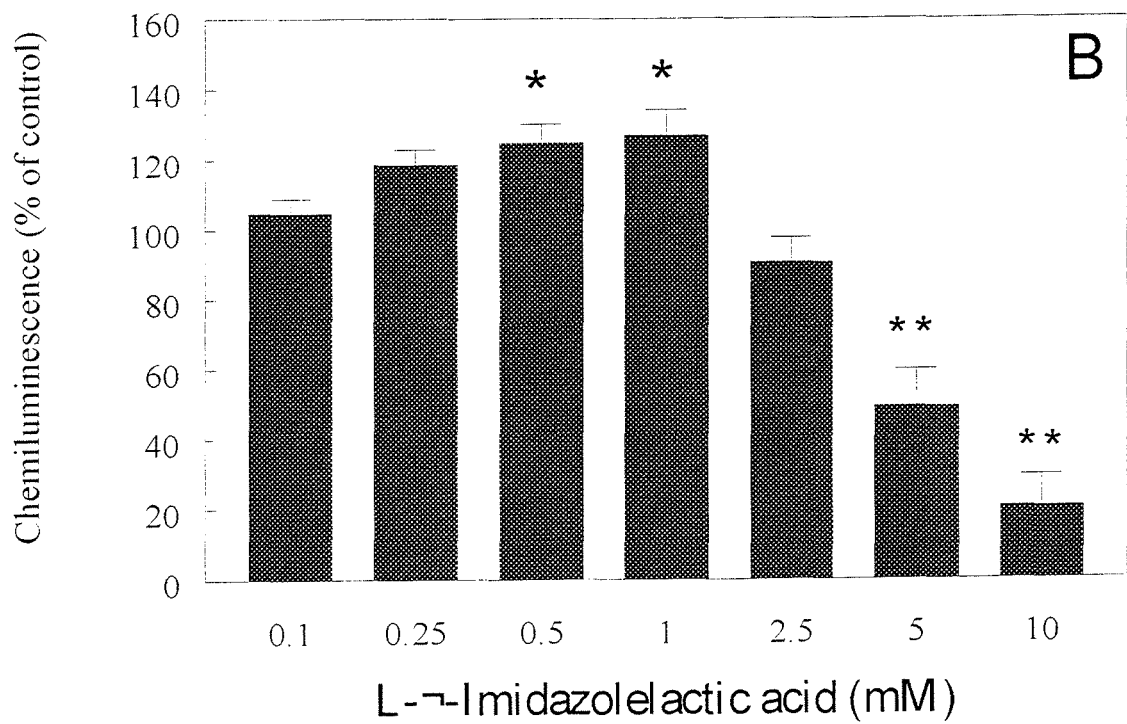
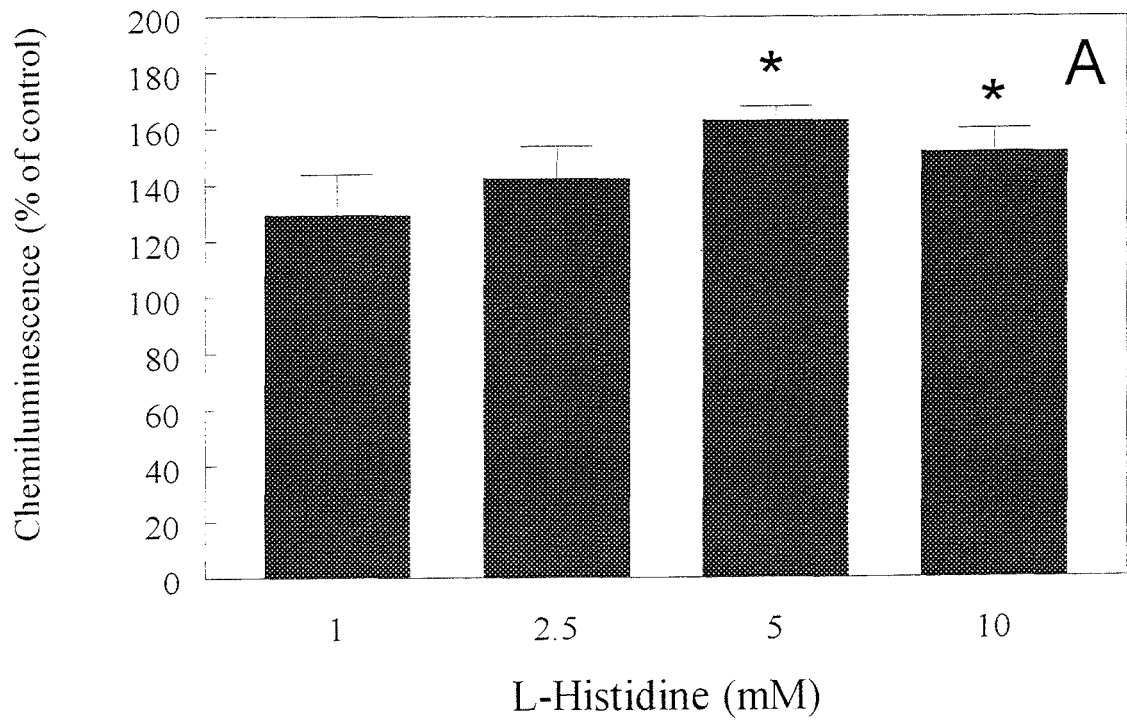
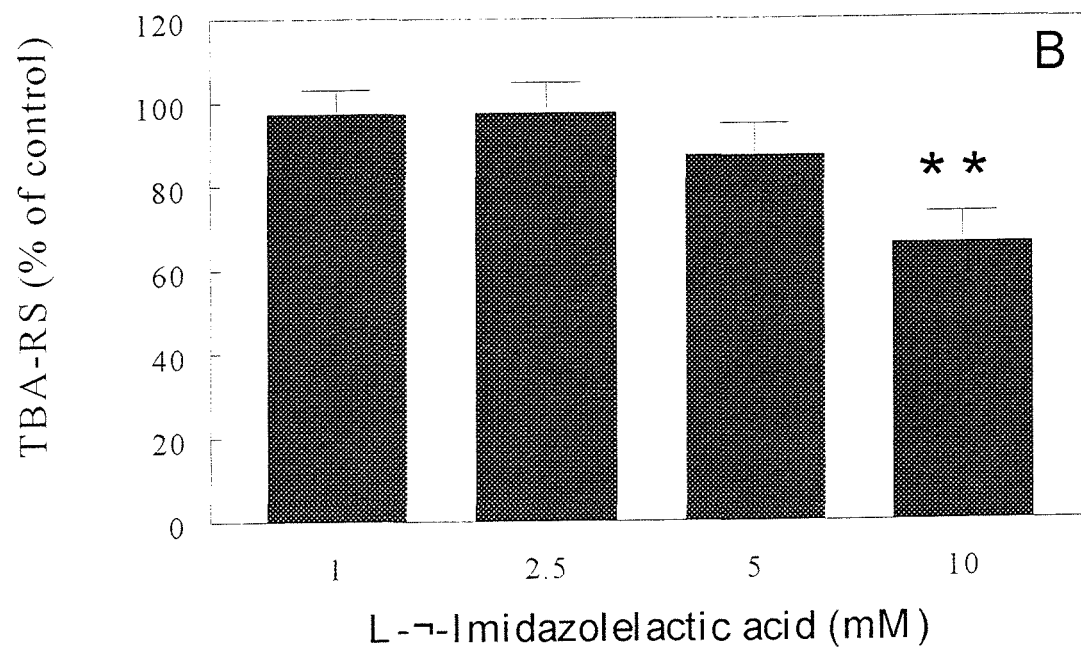
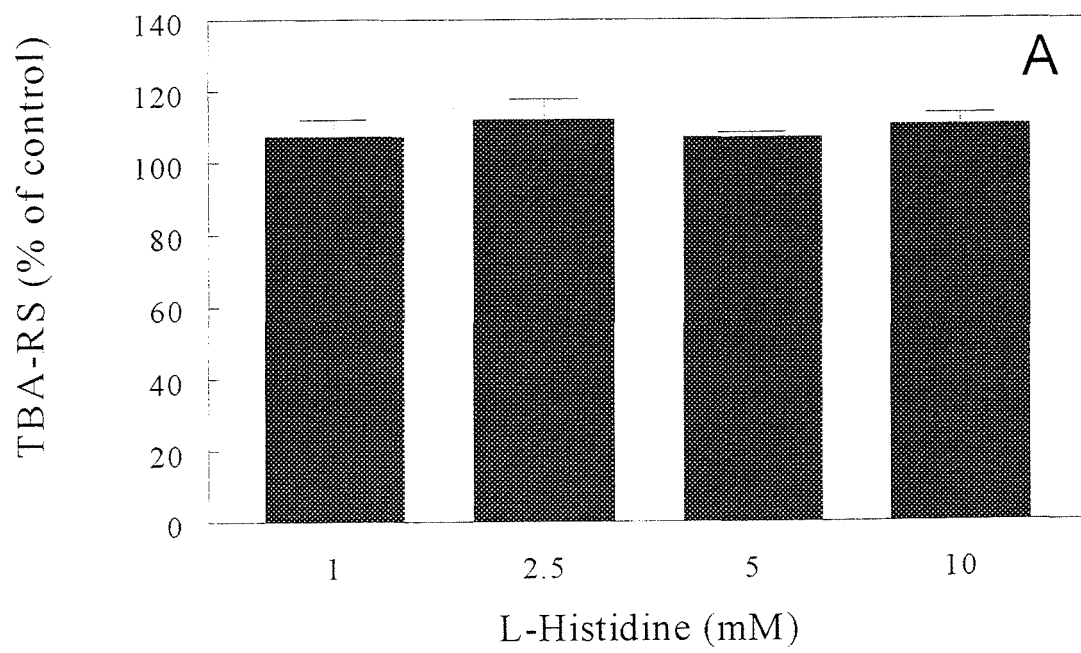


FIGURE 3



Imidazole-4-acetic acid stimulates *in vitro* oxidative stress in cerebral cortex of young rats

Submetido à British Journal of Pharmacology

Imidazole-4-acetic acid stimulates *in vitro* oxidative stress in cerebral cortex of young rats

¹Claudia M. Tansini, ¹Karina Durigon, ¹Carla G. Testa, ²Adriane Belló-Klein, ²Susana Llessuy, ¹Angela T.S. Wyse, ¹Clóvis M.D. Wannmacher, ¹Moacir Wajner & *¹Carlos S. Dutra-Filho

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil and ²Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Running title: Oxidative stress by imidazole-4-acetic acid in CNS

*Corresponding author:

Carlos Severo Dutra-Filho
Departamento de Bioquímica - ICBS
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo
90035-003 Porto Alegre RS
Brasil
Phone +55 51 33165573
Fax +55 51 33165535
Email: dutra@ufrgs.br

Abstract:

- 1** Imidazole-4-acetic acid (I4AA), a γ -aminobutyric acid (GABA) analogue, provokes various effects on the central nervous system consistent with a GABAergic action. Although some of its neuropharmacological effects may be explained by the GABA-receptor ligand properties of I4AA, the mechanisms underlying other effects are poorly understood.
- 2** Since I4AA reduces brain ATP levels and this may provoke oxidative stress, the main objective of the present study was to investigate the effects of I4AA on *in vitro* parameters of oxidative stress in cerebral cortex of young rats.
- 3** Chemiluminescence, thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), total radical-trapping antioxidant (TRAP), and catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities were measured in tissue homogenates from thirty-day-old rats in the presence of I4AA at concentrations of 1 to 10 mM.
- 4** We observed that I4AA significantly stimulates the chemiluminescence and reduces TRAP and catalase activity in cerebral cortex homogenates. It is tempting to speculate that these findings may reflect the involvement of oxidative stress in the neurotoxic effects of I4AA.

Key Words: Imidazole-4-acetic acid; oxidative stress; rat brain

Abbreviations: CAT, catalase; GSH-Px, glutathione peroxidase; I4AA, imidazole-4-acetic acid; SOD, superoxide dismutase; TBA-RS, thiobarbituric acid-reactive substances; TRAP, total radical-trapping antioxidant potential

Introduction

Imidazole-4-acetic acid (I4AA) is a γ -aminobutyric acid (GABA) analog occurring in brain, presenting various neuropharmacological actions in the central nervous system (for a review see Tunnicliff, 1998; Johnston, 2002). Parenteral administration of I4AA provokes a large range of effects such as analgesia, EEG alterations, catalepsy, loss of reflex, induction of a sleep-like or hypnotic state, decrease of the locomotor activity, hyperactivity, ataxia, clonic seizures, in addition to reducing body temperature and blood pressure (Roberts & Simonsen, 1966; Marcus *et al.*, 1971; Freed *et al.*, 1980; MacMillan, 1982a). Many of the depressant effects caused by I4AA may be elicited by its ligand properties to GABA_A and GABA_C receptors. I4AA also binds to the I₁-imidazoline receptor although its exact actions mediated by this receptor has not been determined (Tunnicliff, 1998). I4AA is produced by the catabolism of histidine and histamine (Lee & Yin, 1976; Thomas & Prell, 1995; Prell *et al.*, 1997), although in brain is not clear whether I4AA can be formed by these routes when the precursors are at the physiological concentrations (Prell *et al.*, 1996). Although many effects of I4AA have been reported, its exact functions in the central nervous system are unknown.

Furthermore, various biochemical effects have been attributed to I4AA. The administration of I4AA to animals produces brain accumulation of glucose and intermediates of the citric acid cycle, and this has been considered a reflex of cerebral metabolic depression (MacMillan 1982b; Bovell *et al.*, 1982). In this

context, I4AA severely reduces brain ATP levels and provokes important lactic acidosis during hypoxia (MacMillan 1982b). Other biochemical alterations caused by I4AA has been reported in brain, such as activation of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and inhibition of GABA aminotransferase (Roberts & Simonsen, 1970; Clifford *et al.*, 1973). The latter effect can be responsible for the high levels of GABA observed after injection of I4AA (Tunncliffe, 1976).

It is well known that blockage of ATP synthesis and oxidative stress seem to be interacting processes causing neurodegeneration (Alexi *et al.*, 1998; Cassarino & Bennett Jr., 1999). The central nervous system is markedly sensitive to oxidative stress due to its high oxygen consumption, its high content of iron and lipids, especially polyunsaturated fatty acids, and its low antioxidant defenses (Halliwell, 1992). In addition, oxidative stress has been related to the pathogenesis of many neurological disorders presenting neurodegeneration, epileptic seizures, demyelination and dementia (Resnik & Paker, 1993).

I4AA has been observed at high concentrations in humans in some conditions, such as histidinemia. This inborn error of histidine metabolism is caused by histidase deficient activity which provokes an increase of up to 50 times the urinary excretion of the imidazole derivatives of histidine (Levy *et al.*, 2001). Histidinemia is considered a benign situation in most affected individuals, although, under certain circumstances, the disorder may be harmful to the central nervous system (Levy *et al.*, 2001). In other situations, such as experimental influenza infection and protein-energy malnutrition, a high excretion of I4AA was also reported (Antener *et al.*, 1983; Skoner *et al.*, 2001).

Since the effect of I4AA on parameters of oxidative stress has not been evaluated in the central nervous system, in the present study we investigated the *in vitro* effect of I4AA on chemiluminescence, total radical-trapping antioxidant potential (TRAP), thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), and the activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in rat cerebral cortex. We present evidence that I4AA stimulates oxidative stress in rat cerebral cortex, what may indicate that the role of free radicals in the mechanisms by which I4AA elicits its pharmacological and/or toxicological actions in the central nervous system should be considered.

Methods

Reagents and equipment

All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA. Solutions were prepared using ultra pure grade water. I4AA was prepared on the day of the experiments in the incubation medium used for each technique and the pH adjusted to 7.4 when necessary. Chemiluminescence and TRAP were assayed using a beta scintillation spectrometer (Packard Tricarb 2100TR and Wallac model 1409, respectively), the enzyme activities were measured with a double-beam spectrophotometer with temperature control (Hitachi U-2001) and the TBA-RS were assayed using a Beckman DU 640 spectrophotometer.

Animals

Thirty-day-old Wistar rats bred in the Department of Biochemistry, UFRGS, were used. The dams had free access to water and to a standard commercial chow (Germani, Porto Alegre, RS, Brazil) containing 20.5% protein (predominantly soybean supplemented by methionine), 54% carbohydrate, 4.5% fiber, 4% lipids, 7% ash and 10% moisture. Temperature was maintained at $24 \pm 1^\circ\text{C}$, with a 12-12h light/dark cycle. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for animal research of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, and followed the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications 80-23, revised 1996).

Tissue preparation

On the day of the experiments, animals were killed by decapitation without anesthesia and the brain was immediately removed. Tissue was kept chilled during all procedure. The olfactory bulbs and pons/medulla were discarded and the cerebral cortex was isolated and weighed. Tissue was homogenized 1:10 (w/v) in the incubation medium used for each technique and centrifuged at 1000 g for 10 minutes at 4°C , and the supernatant was immediately used for the measurements.

In vitro experiments

Tissue homogenates were incubated for 1 hour at 37 °C on the presence of I4AA. Controls were incubated with medium only. The final concentration of I4AA in the incubation medium ranged from 1 to 10 mM. After incubation, aliquots were taken to measure chemiluminescence, TBA-RS and TRAP. To test the action of I4AA on the enzymatic antioxidant defenses CAT, SOD and GSH-Px, the acid was added to the incubation medium used to assay each enzyme activity without previous incubation with tissue homogenate.

TBA-RS assay

Measurement of TBA-RS was performed according to Esterbauer and Cheeseman (1990). Briefly, the tissue sample is mixed with two volumes of cold 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) to precipitate protein. The precipitate is pelleted by centrifugation (10 minutes at 1000 g) and an aliquot of the supernatant is added to equal volume of 0.67% (w/v) TBA in a boiling water bath for 25 min. A standard curve is prepared using malondialdehyde bisdiethylacetal as the source of malondialdehyde (MDA). After cooling, the absorbance is read at 532 nm. TBA-RS were represented as nmol per mg protein.

Chemiluminescence assay

Samples were assayed for chemiluminescence in a dark room by the method of Gonzalez-Flecha *et al.* (1991). Incubation flasks contained 3.5 ml of medium

consisting of 20 mM sodium phosphate, pH 7.4, and 140 mM KCl. The background chemiluminescence was measured and 0.5 ml of homogenates immediately added. Chemiluminescence was measured for 10 minutes at room temperature. The background chemiluminescence was subtracted from the total value and results are represented as cps per mg protein.

TRAP assay

TRAP was measured according the method described by Lissi *et al.* (1992). TRAP represents the total antioxidant capacity of the tissue and was determined by measuring the luminol chemiluminescence intensity induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) (ABAP) at room temperature. Four ml of 10 mM ABAP in 0.1 M glycine buffer pH 8.6 were then added to the vial and the background chemiluminescence was measured. Ten μ l of 4 mM luminol were then added and the chemiluminescence was measured. This was considered to be the initial value. Ten μ l of 80 μ M Trolox or homogenates was added and chemiluminescence was measured until it reached the initial levels. The addition of Trolox or tissue homogenate to the incubation medium reduces the chemiluminescence. The time necessary to return to the levels present before the addition was considered to be the induction time. The induction time is directly proportional to the antioxidant capacity of the tissue and was compared to the induction time of Trolox. The results are reported as nmol of Trolox per mg protein.

Catalase assay

CAT activity was assayed by the method of Aebi (1984), which is based on the disappearance of H₂O₂ at 240 nm. One unit is defined as one μ mol of hydrogen peroxide consumed per minute and the specific activity reported as units per mg protein.

Superoxide dismutase assay

SOD activity was assayed by method of Marklund (1984). Cerebral tissue was homogenized 1:10 (w/v) in 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.2 containing 1 mM EDTA. This method is based on the pyrogallol autoxidation which is followed at 420 nm. The pyrogallol autoxidation is highly dependent on O₂⁻ and is inhibited by the presence of SOD. One unit of SOD activity is defined as the amount of SOD that inhibits 50% the pyrogallol autoxidation. The specific activity is represented as units per mg protein.

Glutathione peroxidase assay

GSH-Px activity was measured by the method of Wendel (1981), except for the concentration of NADPH, which was adjusted to 0.1 mM after previous tests performed in our laboratory. Tissue homogenized 1:10 (w/v) in 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.7 plus EDTA. *Tert*-butyl-hydroperoxide was used as substrate. NADPH disappearance was monitored with a spectrophotometer at 340 nm. One GSH-Px unit is defined as one μ mol of

NADPH consumed per minute and specific activity is represented as units per mg protein.

Protein determination

Protein was measured by the method of Lowry *et al.* (1951) using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance followed by Duncan multiple range test when the F value was significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer. P values less than 0.05 were considered to be significant.

Results

First, we tested the effect of I4AA on TRAP, chemiluminescence and TBA-RS. After 1 h incubation of the cerebral cortex homogenates in the presence of I4AA, aliquotes were taken to carry out the measures. Control values (mean \pm SEM) for TRAP, chemiluminescence and TBA-RS were 24.80 ± 1.43 nmol Trolox/mg protein, 380 ± 17.29 cps/mg protein and 0.92 ± 0.06 nmol TBA-RS/mg protein, respectively. I4AA significantly decreased TRAP (Figure 1)

[F(4,30)=4.30; p<0.01] in a dose-dependent manner [β =-0.581; p<0.001]. Chemiluminescence (Figure 2) was increased by I4AA [F(4,25)=23.02; p<0.001] and this effect was dose-dependent [β =0.883; p<0.001]. On the other hand, I4AA did not affect TBA-RS (Figure 3) [F(4,30)=0.376; p>0.05].

To study the impact of I4AA directly on the activity of the antioxidant enzymes, the measurement of CAT, GSH-Px, and SOD activities were carried out in cerebral cortex homogenates in the presence of I4AA without previous incubation. Control values (mean \pm SEM) for CAT, GSH-Px and SOD activities were 4.86 \pm 0.24 U/mg protein, 16.50 \pm 1.11 U/mg protein and 17.71 \pm 1.62 U/mg protein, respectively. I4AA significantly decreased CAT activity (Figure 4) [F(4,35)=8.98; p<0.001] in cerebral cortex at concentrations of 5 mM and above in a dose-dependent manner [β =-0.71; p<0.001]. On the other hand, I4AA did not affect the activities of GSH-Px (Figure 5) [F(4,25)=1.03; p>0.05] and SOD (Figure 6) [F(4,25)=0.36; p>0.05] *in vitro*.

Discussion

A depressant effect of I4AA on the central nervous system which appears to be mediated through its action on GABAergic receptors has been documented (Bowery & Jones, 1976; Freed *et al.*, 1980, MacMillan 1982a; Qian & Dowling, 1994). Deleterious effects of this drug on the energy metabolism of neuronal cells have been also reported (MacMillan 1982b; Bovell *et al.*, 1982). Deficit of ATP synthesis can result in increased reactive oxygen species production and altered calcium homeostasis, which in turn can potentially cause

cell death (Cassarino & Bennet Jr., 1999). Free radicals can be very damaging to cells, leading to oxidation of essential cellular constituents such as lipids, proteins and DNA, which can be measured by identification of their by-products. The brain is particularly susceptible to oxidation by these highly reactive species, because of the high content of polyunsaturated fatty acids in the mitochondrial and plasma membranes and also due to its relatively poor antioxidant defences. Oxidative damage to proteins may also impair Krebs cycle and respiratory chain activities, which in turn enhance reactive oxygen species generation leading to oxidative damage in a vicious cycle (Alexi *et al.*, 1998). Concomitant reduction of ATP may ultimately cause diminished Na⁺/K⁺-ATPase activity leading to membrane depolarization and loss of cellular homeostasis, further contributing to cell death. These mechanisms seem to act together in a number of neurodegenerative disorders, such as Parkinson's disease, Huntington's disease, Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, and also in aging (Cassarino & Bennet Jr., 1999; Alexi *et al.*, 1998). Another consequence of ATP deficiency from damaged mitochondrial function is depletion of cellular glutathione, another important factor in continuing and increasing oxidative stress in the brain (Bains & Shaw, 1997).

So, it is feasible to suppose that the impairment of energy metabolism attributed to I4AA may lead to free radical production, consequently causing neuronal damage. In addition, the study of the mechanisms responsible for the I4AA action in brain may contribute to better understand the behavioral and electroencephalographic disturbances observed in animals under I4AA influence (Roberts & Simonsen, 1966; Freed *et al.*, 1980).

In this study we demonstrate that I4AA stimulates chemiluminescence and reduces TRAP and catalase activity in rat cerebral cortex or, in other words, provokes a state known as oxidative stress which is characterized by an unbalance between pro-oxidants and antioxidants. In addition, a dose-dependent effect was observed on all parameters altered by I4AA, what may indicate the potential increasing toxicity of this substance relatively to its concentration. To our knowledge, this is the first report showing that I4AA affects oxidative stress parameters in brain. The effects of compounds possessing an imidazole ring in its chemical structure on free radical production are ambiguous. Some investigators demonstrated that histidine, a imidazole amino acid, potentiates the cytotoxicity mediated by hydrogen peroxide (Oya and Yamamoto, 1988; Cantoni *et al.*, 1994) and induces lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum (Erickson and Hultin, 1992). In contrast, antioxidant properties of imidazole-containing dipeptides, such as carnosine, have been extensively known (Boldyrev, 1990).

I4AA accumulates in histidinemia, an inherited metabolic disorder caused by histidase deficiency, in which histidine, imidazolepyruvic acid and imidazolelactic acid also accumulate in blood and tissues. The amount of I4AA in urine of histidinemic patients is up to fifty-fold greater than those of normal individuals. Although many affected individuals are clinically normal, a considerable number of others have neurologic abnormalities (Levy *et al.*, 2001). However, maximal concentrations of I4AA which may be reached in brain of these patients, especially during crises, are not known. Assuming that the levels of I4AA in histidinemic patients are below the concentrations which

provoked in vitro stimulation of oxidative stress reported in this study, at present it is difficult to presume the involvement of oxidative stress as an underlying mechanism responsible for the neurological findings observed in these patients.

In conclusion, the results of the present study indicate that oxidative stress is one of the potential mechanisms by which I4AA elicits its neurotoxic action in brain. Considering that I4AA accumulates in histidinemia but its cerebral levels in this situation is unknown, we suggest that oxidative stress parameters should be monitored in histidinemic patients. Additional studies on the influence of I4AA on the *in vivo* production of free radicals and antioxidant defenses in brain should be also carried out in order to confirm and better characterize our present *in vitro* findings.

This research was supported by grants from the Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX), Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPESQ/UFRGS) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

AEBI, H. (1984). Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.*, **105**, 121-126.

ALEXI, T., HUGHES, P.E., FAULL, R.L.M. & WILLIAMS, C.E. (1998). 3-Nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathways of neurodegeneration. *NeuroReport*, **9**, R57-R64.

ANTENER, I., VERWILGHEN, A.M., VAN GEERT, C. & MAURON, J. (1983). Biochemical study of malnutrition. Part VI: Histidine and its metabolites. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **53**, 199-209.

BAINS, J.S. & SHAW, C.A. (1997). Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res. Rev.*, **25**, 335-358.

BOLDYREV, A.A. (1990). Retrospectives and perspectives on the biological activity of histidine-containing dipeptides. *Int. J. Biochem.*, **22**, 129-132.

BOVELL, M., CHUNG, T., MACMILLAN, V. & SHANKARAN, R. (1982). The effects of imidazole-4-acetic acid on cerebral carbohydrate metabolism. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **60**, 1610-1617.

BOWERY, N.G. & JONES, G.P. (1976). A comparison of gamma-aminobutyric acid and the semi-rigid analogues 4-aminotetrolic acid, 4-aminocrotonic acid and imidazole-4-acetic acid on the isolated superior cervical ganglion of the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **56**, 323-330.

BUEGE, J.A. & AUST, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.*, **52**, 302-309.

CANTONI, O., GUIDARELLI, A., SESTILI, P., GIACOMONI, P.U. & CATTABENI F. (1994). L-Histidine-mediated enhancement of hydrogen peroxide-induced cytotoxicity: relationships between DNA single/double strand breakage and cell killing. *Pharmacol. Res.*, **29**, 169-178.

CASSARINO, D.S. & BENNETT JR., J.P. (1999). An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res. Rev.*, **29**, 1-25.

CLIFFORD, J.M., TABERNER, P.V., TUNNICLIFF, G., RICK, J.T. & KERKUT, G.A. (1973). Biochemical and pharmacological actions of imidazoleacetic acid. *Biochem. Pharmac.*, **22**, 535-542.

ERICKSON, M.C. & HULTIN, H.O. (1992). Influence of histidine on lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.*, **292**, 427-432.

ESTERBAUER, H. & CHEESEMAN, K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth. Enzymol.*, **186**, 407-421.

FREED, W.J., GILLIN, J.C. & WYATT, R.J. (1980). Anomalous behavioral response to imidazoleacetic acid, a GABA agonist, in animals treated chronically with haloperidol. *Biol. Psychiatr.*, **15**, 21-35.

GONZALEZ-FLECHA, B., LLESUY, S. & BOVERIS, A. (1991). Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Rad. Biol. Med.*, **10**, 93-100.

HALLIWELL, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.*, **59**, 1609-1623.

JOHNSTON, G.A. (2002). Medicinal chemistry and molecular pharmacology of GABA (C) receptors. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2**, 903-913.

LEE, S.C. & YIN, S.J. (1976). Thin-layer separation of imidazole compounds and its application to radiotracing studies brain histidine metabolism. *J. Chromatogr.*, **129**, 482-487.

LEVY, H.L., TAYLOR, R.G., & MCINNES, R.R. (2001). Disorders of histidine metabolism. In *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*. ed. Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D. pp. 1807-1820. New York: McGraw-Hill.

LISSI, E., PASCUAL, C. & DEL CASTILLO, M.D. (1992). Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) thermolysis. *Free Rad. Res. Comm.*, **17**, 299-311.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-267.

MACMILLAN, V. (1982a). The effects of imidazole-4-acetic acid on cerebral indole amine metabolism. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **60**, 308-312.

MACMILLAN, V. (1982b). The effects of imidazole-4-acetic acid upon the energy metabolism of normoxic and hypoxic rat brain. *Brain Res.*, **232**, 439-448.

MARCUS, R.J., WINTERS, W.D., ROBERTS, E. & SIMONSEN, D.G. (1971). Neuropharmacological studies of imidazole-4-acetic acid actions in the mouse and rat. *Neuropharmacology*, **10**, 203-215.

MARKLUND, S.L. (1985). Pyrogallol Autoxidation. In *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. ed. Greenwald, R.A. pp. 243-247. Boca Raton: CRC Press.

OYA, Y. & YAMAMOTO, K. (1988). The biological activity of hydrogen peroxide. IV. Enhancement of its clastogenic actions by coadministration of L-histidine. *Mutation Res.*, **198**, 233-240.

PRELL, G.D., DUOYON, E., SAWYER, W.F. & MORRISHOW, A.M. (1996). Disposition of histamine, its metabolites, and pros-methylimidazoleacetic acid in brain regions of rats chronically infused with α -fluoromethylhistidine. *J. Neurochem.*, **66**, 2153-2159.

PRELL, G.D., MORRISHOW, A.M., DUOYON, E. & LEE, W.S. (1997). Inhibitors of histamine methylation in brain promote formation of imidazoleacetic acid, which interacts with GABA receptors. *J. Neurochem.*, **68**, 142-151.

QIAN, H. & DOWLING, J. E. (1994). Pharmacology of novel GABA receptors found on rod horizontal cells of the white perch retina. *J. Neurosci.*, **14**, 4299-4307.

REZNICK, A.Z. & PACKER, L. (1993). Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. In *Free Radicals: from Basic Science to Medicine*. ed. Poli, G., Albano, E. and Dianzani, M.U. pp. 425-437. Basel: Birkhäuser Verlag.

ROBERTS, E. & SIMONSEN, D.G. (1966). A hypnotic and possible analgesic effect of imidazoleacetic acid in mice. *Biochem. Pharmacol.*, **15**, 1875-1877.

SKONER, D.P., GENTILE, D.A., FIREMAN, P., CORDORO, K. & DOYLE, W.J. (2001). *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **87**, 303-306.

THOMAS, B. & PRELL, G.D. (1995). Imidazoleacetic acid, gamma-aminobutyric acid receptor agonist, can be formed in rat brain by oxidation of histamine. *J. Neurochem.*, **65**, 818-826.

TUNNICLIFF, G. (1976). Centrally-acting drugs and the formation of brain γ -aminobutyric acid. *Gen. Pharmacol.*, **7**, 259-262.

TUNNICLIFF, G. (1998). Pharmacology and function of imidazole 4-acetic acid in brain. *Gen. Pharmacol.*, **31**, 503-509.

WENDEL, A. (1981). Glutathione Peroxidase. *Meth. Enzymol.*, **77**, 325-332.

Figure Legends

Figure 1 Effect of imidazole-4-acetic acid on total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) in cerebral cortex of young rats. Results are means \pm S.E.M. (n=7) expressed in % of controls for experiments performed in duplicate. *p<0.05 and **p<0.01 significantly different from controls (Duncan multiple range test).

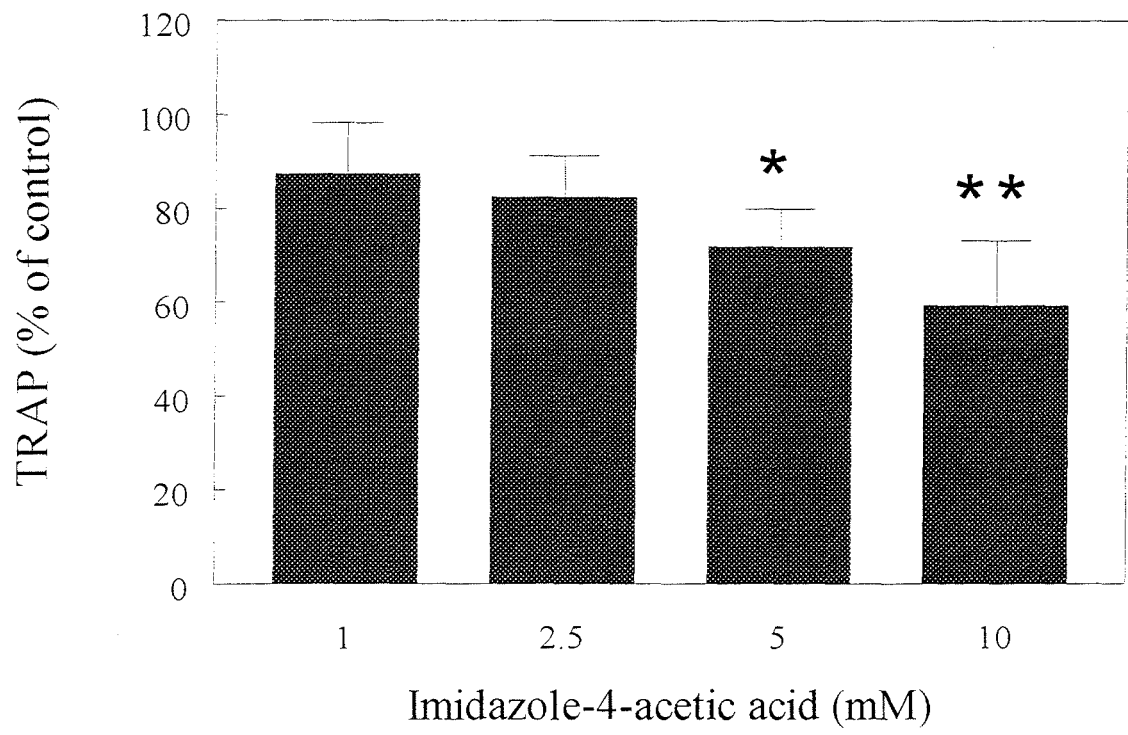
Figure 2 Effect of imidazole-4-acetic acid on chemiluminescence in cerebral cortex of young rats. Results are means \pm S.E.M. (n=6) expressed in % of controls for experiments performed in duplicate. *p<0.05 and **p<0.01 significantly different from controls (Duncan multiple range test).

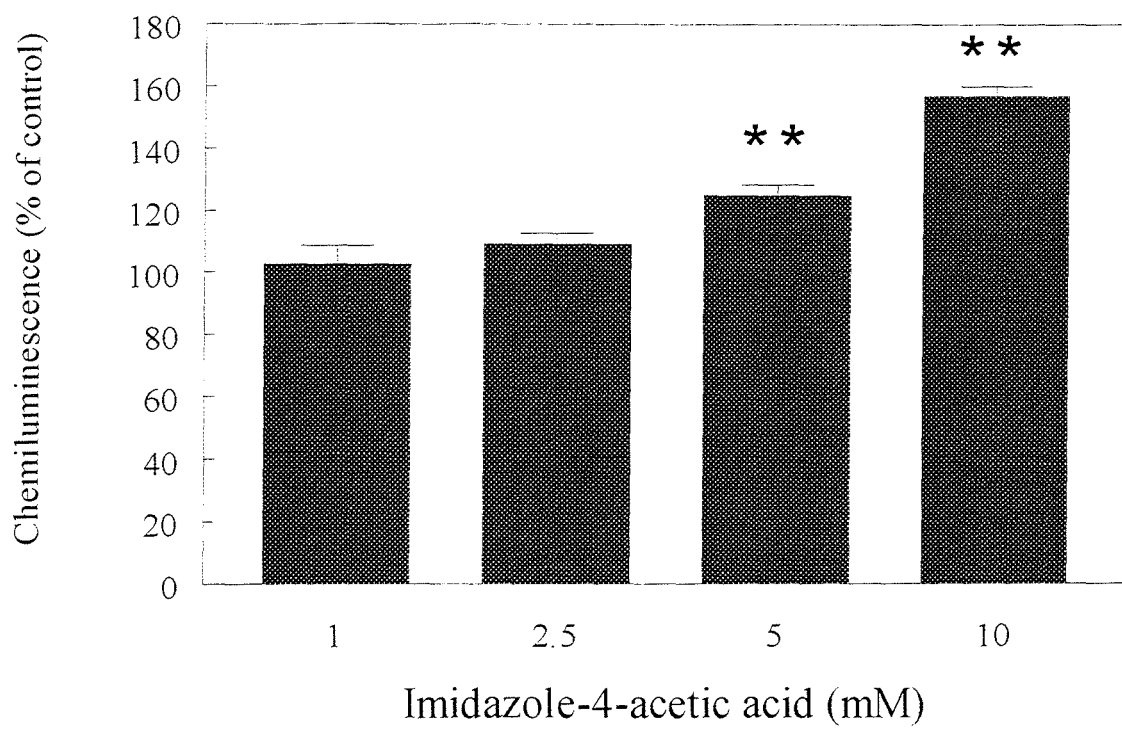
Figure 3 Effect of imidazole-4-acetic acid on thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) in cerebral cortex of young rats. Results are means \pm S.E.M. (n=7) expressed in % of controls for experiments performed in duplicate. No significant differences from controls were observed (ANOVA).

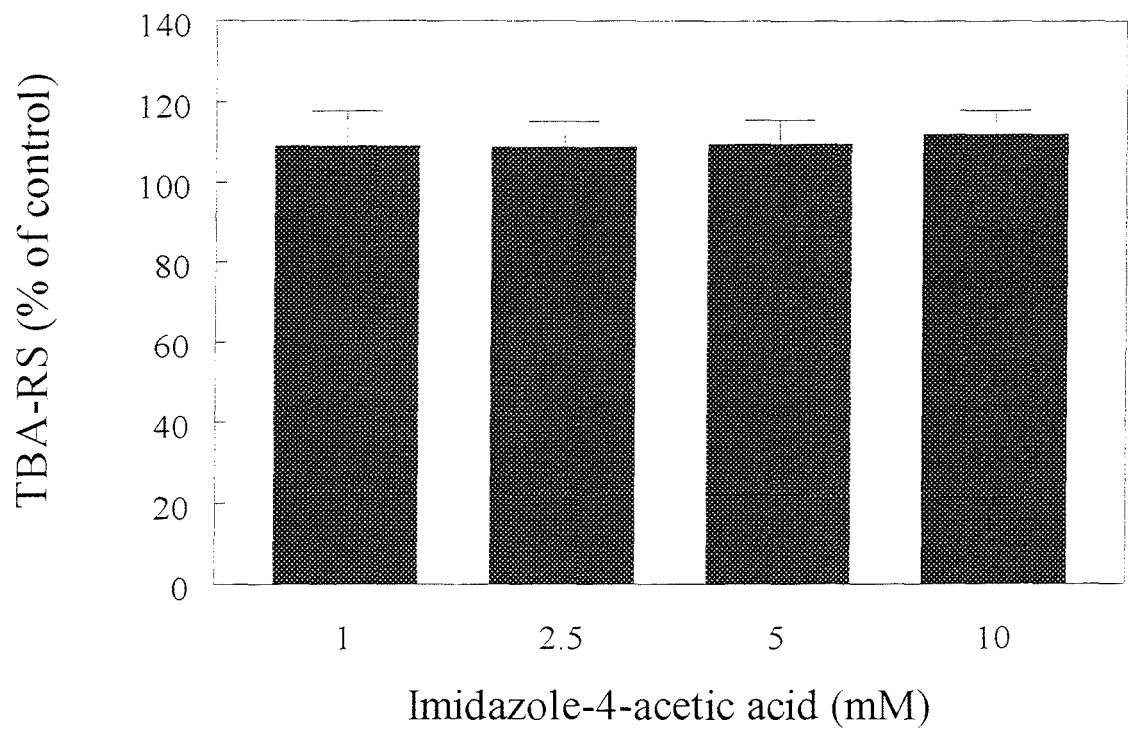
Figure 4 Effect of imidazole-4-acetic acid on catalase (CAT) activity in cerebral cortex of young rats. Results are means \pm S.E.M. (n=8) expressed in % of controls for experiments performed in duplicate. *p<0.05 and **p<0.01 significantly different from controls (Duncan multiple range test).

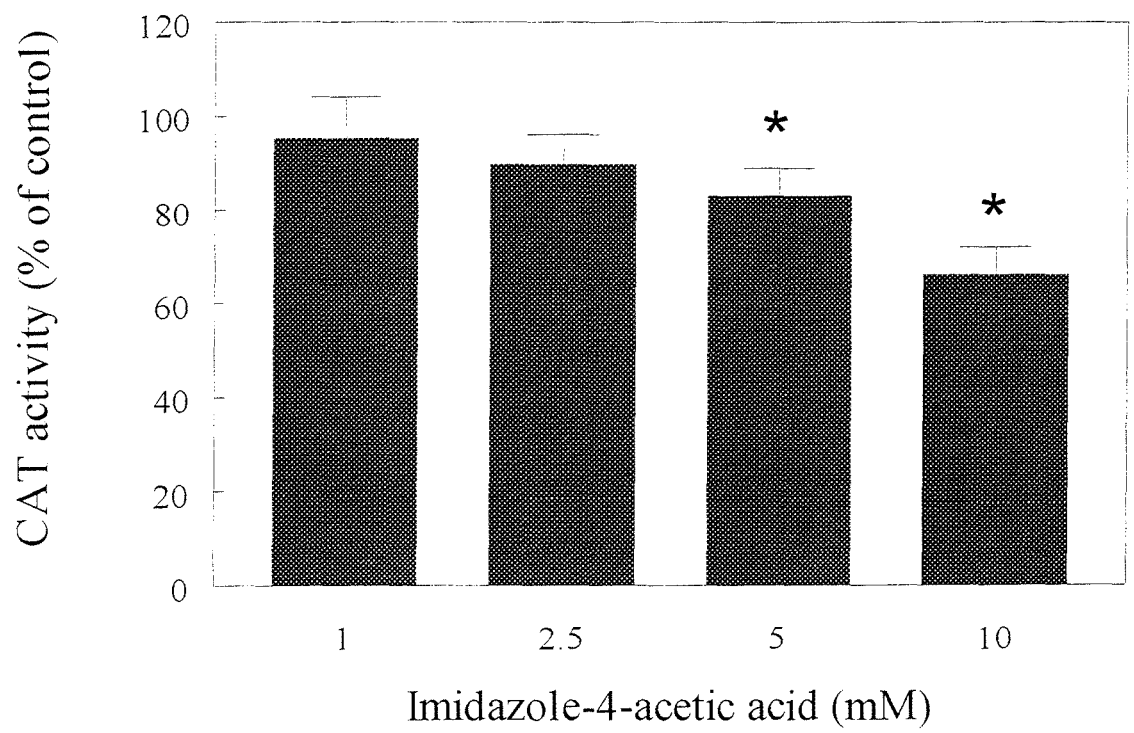
Figure 5 Effect of imidazole-4-acetic acid on glutathione peroxidase (GSH-Px) activity in cerebral cortex of young rats. Results are means \pm S.E.M. (n=6) expressed in % of controls for experiments performed in duplicate. No significant differences from controls were observed (ANOVA).

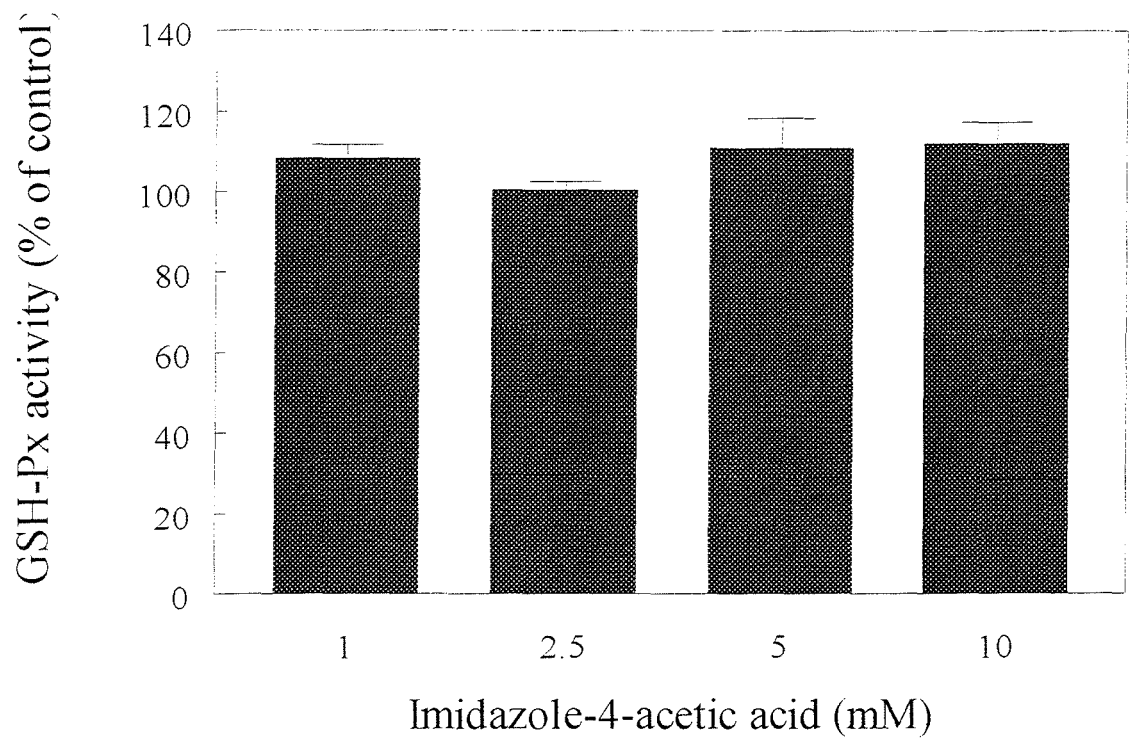
Figure 6 Effect of imidazole-4-acetic acid on superoxide dismutase (SOD) activity in cerebral cortex of young rats. Results are means \pm S.E.M. (n=6) expressed in % of controls for experiments performed in duplicate. No significant differences from controls were observed (ANOVA).

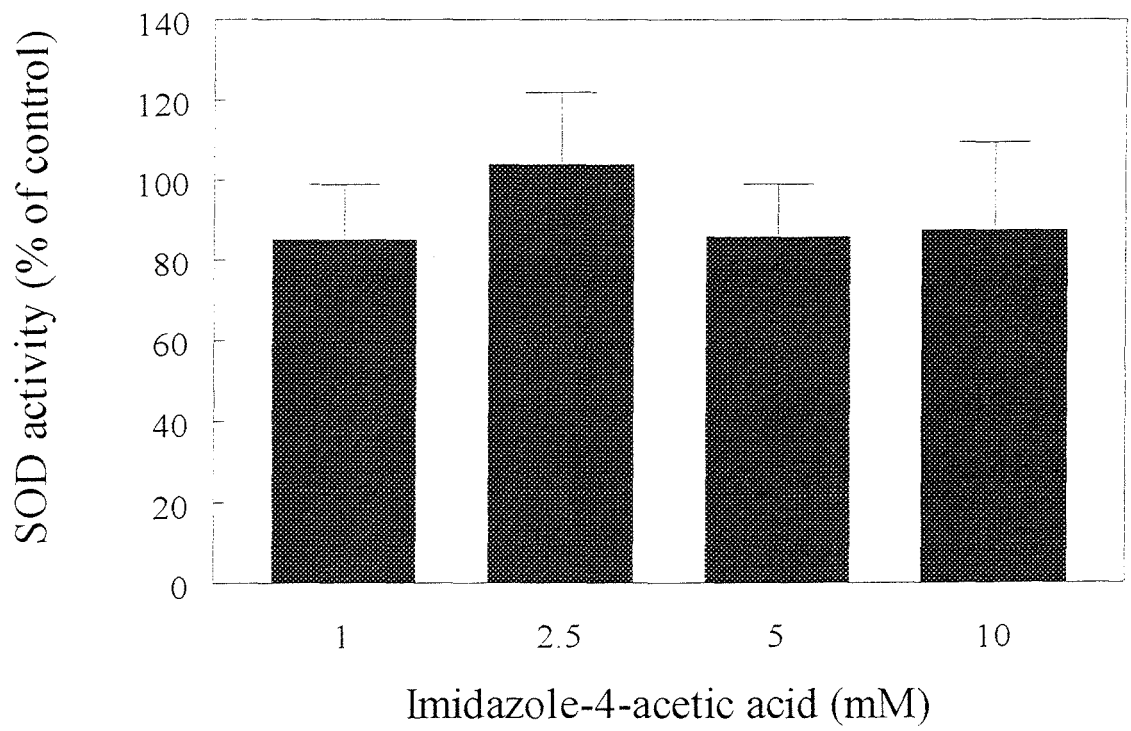












IV. DISCUSSÃO

Alguns efeitos da histidina sobre parâmetros relacionados a estresse oxidativo já foram descritos. A histidina aumenta os efeitos clastogênicos do peróxido de hidrogênio em cromossomos e em cromatide de fibroblastos embrionários humanos (Oya e Yamamoto, 1988), estimula a lipoperoxidação em retículo sarcoplasmático, na presença de ferro (Erickson & Hultin, 1992) e aumenta a toxicidade do peróxido de hidrogênio sobre células em cultura, levando à quebra de fitas duplas e simples de DNA e morte celular (Cantoni et al., 1994).

A histidinemia, desordem do metabolismo da histidina devido à deficiência na atividade da enzima histidase, tem como conseqüências bioquímicas do bloqueio metabólico: aumento das concentrações de histidina e seus metabólitos (ácido imidazolpirúvico, ácido imidazolático e ácido imidazolacético) na urina, aumento de histidina de quatro a vinte vezes no sangue, aumento das concentrações de histidina no líquido cefaloraquidiano e deficiência de ácido urocânico. Em pacientes sintomáticos, há alguns casos em que ocorre retardo mental e defeitos na fala (Levy et al., 2001). A histidase, uma enzima citosólica, é expressa com alta atividade no fígado de toda espécie animal e em pele de muitos mamíferos (Dhanam et al., 1976; Bhargava et al., 1976; Baden et al., 1969). O ácido urocânico é particularmente deficiente na pele nos pacientes histidinêmicos (Levy et al., 1995). Dois diferentes papéis para o ácido urocânico na epiderme têm sido propostos, um é de ser um protetor natural contra a luz ultravioleta, o outro é um mediador da supressão do sistema imune induzido por luz UV (Morrison, 1985; Norval et al., 1989). Estudos relatam que o ácido urocânico é um bom *scavenger* de radical hidroxil

(Kammeyer et al., 1999). Isto sugere a possibilidade de pacientes histidinêmicos terem um status antioxidante diminuído. Além disso, estudos sugerem que L-histidina aumenta a incorporação de H_2O_2 para dentro das células e acentua formação de 8-oxodeoxiguanosine por UV-C mais H_2O_2 , mas não por H_2O_2 apenas (Yoa-ohta et al., 2001).

A neurofisiopatologia da doença não é bem conhecida, por isso resolvemos estudar o efeito da histidina e seus metabólitos, ácido imidazolacético, ácido imidazolático e carnosina, sobre parâmetros de estresse oxidativo.

Neste estudo, nós observamos que a histidina causou um aumento na quimioluminescência e uma redução no TRAP em córtex cerebral ratos jovens. A alteração de ambos os parâmetros acima é um forte indicativo que a histidina aumenta o estresse oxidativo no cérebro de ratos sendo que este processo é definido como um desequilíbrio entre produção de radicais livres e das defesas antioxidantes. A medida de TBA-RS não foi alterada pela histidina.

De fato, o sistema nervoso central é especialmente sensível a espécies ativas de oxigênio (EAO): o cérebro é um órgão metabolicamente muito ativo, é responsável por aproximadamente 20% do consumo basal de oxigênio, tem alto conteúdo de ferro, grande quantidade de lipídios insaturados e baixas defesas antioxidantes. Várias doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Parkinson, doença de Alzheimer, esclerose amiotrófica lateral, entre outras, têm sido associadas com estresse oxidativo (Halliwell, 2001).

Foi também testado o efeito da histidina sobre a atividade das principais enzimas responsáveis pelas defesas antioxidantes, em homogeneizado de

córtex cerebral de ratos jovens. A histidina não alterou a atividade de nenhuma das enzimas antioxidantes, a saber superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase.

O ácido imidazolacético (IAA) produz diversos efeitos neurofarmacológicos, como analgesia, perda de reflexo e efeitos hipnóticos em camundongos e diversas outras espécies (Roberts e Simonsen, 1966). Outros estudos mostram que o IAA está relacionado com alterações eletroencefalográficas que sugerem excitação cortical. Foi observado que, assim como a histidina, o ácido imidazolacético (IAA) aumentou a quimioluminescência e diminuiu o TRAP em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens. Nas duas técnicas mencionadas acima o efeito do ácido imidazolacético foi dose-dependente. Nós também observamos que o IAA não afeta a medida de TBA-RS. O IAA nas concentrações de 5 e 10 mM diminuiu a atividade da catalase de uma maneira dose-dependente, sendo que as atividades da superóxido dismutase e da glutathione peroxidase não foram alteradas por este ácido, mostrando o efeito específico do ácido.

O ácido imidazolático alterou as medidas de lipoperoxidação, diminuindo as TBA-RS na concentração de 10,0 mM e a quimioluminescência nas concentrações de 5,0 e 10,0 mM (o que indica um efeito antioxidante). Por outro lado, a quimioluminescência foi aumentada pelo ácido nas concentrações de 0,5 e 1,0 mM (o que indica um efeito oxidante). Estes resultados indicam que o ácido imidazolático apresenta um efeito protetor *in vitro* em concentrações acima de 5,0 mM. Além disso, nós observamos que o ácido imidazolático aumenta a atividade de SOD na concentração de 10,0 mM. As

atividades das enzimas catalase e glutathione peroxidase, não foram alteradas na presença do ácido imidazolático. Esses resultados sugerem o efeito protetor do ILA também nas defesas antioxidantes enzimáticas, mais especificamente aumentando a atividade da SOD.

Nós também testamos o efeito da carnosina em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo. A carnosina é um dipeptídeo derivado da histidina, sendo um neuroprotetor endógeno contra a ação de radicais livres (Boldyrev et al., 1997). A carnosina não tem efeito significativo sobre o TRAP, tal como descrito anteriormente por Salim-Hanna et al., 1991, em um estudo que mostra que a adição de carnosina até 17 mM não produz qualquer proteção antioxidante significativa na medida do TRAP.

Contudo, na quimioluminescência em concentrações de 1,0 a 10,0 mM, a carnosina apresentou efeito protetor em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens. Na medida de TBA-RS, como previamente relatado (Hipkiss et al., 1997), a carnosina tem efeito protetor nas concentrações de 5,0 e 10,0 mM.

Em contraste ao efeito prooxidante da histidina *in vitro* visto em córtex cerebral de ratos jovens sobre vários parâmetros de estresse oxidativo (aumento da quimioluminescência e diminuição do TRAP) e do efeito também prooxidante do ácido imidazolacético (que diminui o TRAP, aumenta a quimioluminescência e diminui a atividade da catalase), os outros metabólitos da histidina estudados, o ácido imidazolático e a carnosina, têm efeito antioxidante em vários parâmetros de estresse oxidativo, mas apenas nas concentrações mais altas utilizadas.

Na histidinemia, as concentrações de histidina no sangue variam de 290 a 1420 μM (normal, 70 para 120 μM) (Levy, 1989; Levy et al., 1974). A histidina também está aumentada no líquido cefaloraquidiano. Wadman et al. (1967) encontrou um aumento de dez vezes na concentração de histidina no líquido cefaloraquidiano em um paciente, com valores de 142 e 129 μM comparado com o valor normal de 13 μM (Wadman et al., 1967). Na urina, os valores dos metabólitos da histidina, ácidos imidazolático e imidazolacético estão de 5 a 50 vezes mais altos do que o normal (Wadman et al., 1971). Em contraste à sua presença na urina, esses metabólitos não são detectados no sangue, provavelmente porque há pouca ou nenhuma capacidade para sua reabsorção renal (Levy et al., 2001). A carnosina também é relatada por estar aumentada na histidinemia (Carton et al., 1970).

Em alguns estudos, a histidina parece ter efeito protetor, porém este efeito é visto em concentrações de 25 mM ou em valores acima deste (Obata et al., 1999; Obata et al., 1999; Obata et al., 2000; Obata et al., 2001). Por outro lado, em outros estudos mostrando o efeito prooxidante da histidina, foram usadas concentrações em geral mais baixas do que as utilizadas neste trabalho. A L-histidina (0,05 mM) aumenta os efeitos clastogênicos do peróxido de hidrogênio em cromossomos e em cromátide de fibroblastos embrionários humanos (Oya & Yamamoto, 1988), aumenta a degradação de DNA por H_2O_2 em níveis em 0,1 para 1 mM (Tachon & Giacomoni, 1989), media o aumento do peróxido de hidrogênio induzindo citotoxicidade e formação de quebra de fitas de DNA em concentração de 1 mM (Cantoni et al., 1994), e induz lipoperoxidação em retículo sarcoplasmático em concentrações acima de 2,5

mM (Erickson & Hultin, 1992). Além disso, a histidina (0,3 mM) media o aumento de H₂O₂ induzindo citotoxicidade em culturas de células de mamíferos e em níveis em 0,05 a 0,2 mM aumenta a entrada de H₂O₂ para dentro das células e acentua a formação de 8-oxodeoxiguanosine induzida por UV-C mais H₂O₂ (Yoa-Ohta et al., 2001).

Juntamente, estes trabalhos sugerem que a histidina em concentrações baixas, tem efeito prooxidante. Portanto, o efeito prooxidante da histidina deve ser mais importante que o efeito antioxidante de seus metabólitos, ácido imidazolático e carnosina considerando as concentrações relacionadas a histidinemia.

Por outro lado, nossos resultados sugerem que a histidina *in vitro* induz estresse oxidativo apenas em concentrações acima de 2,5 mM. Se os efeitos apresentados neste trabalho estão envolvidos na fisiopatologia cerebral de pacientes histidinêmicos sintomáticos é uma questão que permanece ainda em aberto. Portanto, mais estudos são necessários para melhor caracterizar o papel de histidina e seus metabólitos sobre estresse oxidativo no sistema nervoso central, em especial na histidinemia.

V. CONCLUSÃO

Este trabalho possibilitou as seguintes conclusões:

A L-histidina aumentou a quimioluminescência e reduziu o TRAP, porém não alterou as medidas de TBA-RS. A L-histidina não alterou significativamente as atividades das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathiona peroxidase.

O ácido imidazol-4-acético aumentou a quimioluminescência e reduziu o TRAP, e não alterou as medidas de TBA-RS. O ácido imidazol-4-acético diminuiu a atividade da enzima catalase, mas não alterou as atividades das enzimas superóxido dismutase e glutathiona peroxidase. Todos os efeitos demonstrados foram dose-dependente.

O ácido imidazolático aumentou a quimioluminescência nas concentrações de 0,5 e 1 mM e diminuiu a quimioluminescência nas concentrações a partir de 5 mM, assim como reduziu as medidas de TBA-RS na concentração de 10 mM. O TRAP não foi alterado pelo ácido orgânico. O ácido imidazolático aumentou a atividade da enzima superóxido dismutase, mas não alterou as atividades das enzimas catalase e glutathiona peroxidase.

A carnosina diminuiu a quimioluminescência em todas as concentrações testadas de maneira dose-dependente. A carnosina também diminuiu a medida de TBA-RS, porém não alterou o TRAP.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebi H., (1984) Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* 105, 121-126.

Alexi T., Hughes P.E., Faull R.L.M. and Williams C.E., (1998) 3-Nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathways of neurodegeneration. *NeuroReport* 9, R57-R64.

Antener I, Verwilghen A.M., Van Geert C and Mauron J., (1983) Biochemical study of malnutrition. Part VI: Histidine and its metabolites. *Int J Vitam Nutr Res* 53, 199-209.

Auerbach V.H., DiGeorge A.M., Baldrige R.C., Tourtellotte C.D. and Brigham M.P., (1962) Histidinemia: A deficiency in histidase resulting in the urinary excretion of histidine and imidazolepyruvic acid. *J Pediatr* 60, 487-497.

Baden H.P., Sviokla S. and Maderson P.F.A., (1969) A comparative study of histidase activity in amphibian, avian, reptilian and mammalian epidermis. *Comp Biochem Physiol* 30, 889-894.

Bains J.S. and Shaw C.A., (1997) Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Rev* 25, 335-358.

Beaudet, A.L., Scriver, C.R., Sly, W.S. and Valle, D., (1995) In: The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. and Valle, D. (eds.), 7th ed. MacGraw-Hill, New York, pp. 53-118.

Bhargava M.M. and Feilgeson M., (1976) Studies on the mechanisms of histidase development in rat skin and liver. I. Basis for tissue specific developmental changes in catalytic activity. *Dev Biol* 48, 212-225.

Boldyrev A.A., (1990) Retrospectives and perspectives on the biological activity of histidine-containing dipeptides. *Int J Biochem* 22, 129-132.

Boldyrev A.A., Stvolinsky S.L., Tyulina O.V., Koshelev V.B., Hori N. and Carpenter D.O., (1997) Biochemical and physiological evidence that carnosine is an endogenous neuroprotector against free radicals. *Cell Mol Neurobiol* 17, 259-271.

Bovell M., Chung T., MacMillan V. and Shankaran R., (1982) The effects of imidazole-4-acetic acid on cerebral carbohydrate metabolism. *Can J Physiol Pharmacol* 60, 1610-1617.

Bowery N. G. and Jones G. P., (1976) A comparison of gamma-aminobutyric acid and the semi-rigid analogues 4-aminotetrolic acid, 4-aminocrotonic acid and imidazole-4-acetic acid on the isolated superior cervical ganglion of the rat. *Br. J. Pharmacol* 56, 323-330.

Bredt D.S., (1999) Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res* 31, 577-596.

Buege J.A. and Aust S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation *Meth. Enzimol* 52, 302-309.

Cantoni O., Guidarelli A., Sestili P., Giacomoni P.U., Cattabeni F., (1994) L-Histidine-mediated enhancement of hydrogen peroxide-induced cytotoxicity: relationships between DNA single/double strand breakage and cell killing. *Pharmacol Res* 29, 169-178.

Cantoni O., Sestili P., Brandi G., Cattabeni F., (1994) L-Histidine-mediated enhancement of hydrogen peroxide-induced cytotoxicity is a general response in cultured mammalian cell lines and is always associated with the formation of DNA double strand breaks. *FEBS Letters* 353, 75-78.

Carton D., Dhondt F., De Schrijver F., Samyn W., Kint J., Debelke M.J. and Hooft C., (1970) Histidinemia. *Helv Paediatr Acta* 25, 127-134.

Cassarino D.S. and Bennett Jr. J.P. (1999) An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res Rev* 29, 1-25.

Chance B., Sies H. and Boveris A., (1979) Hidroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59, 527-605.

Clifford J.M., Taberner P.V., Tunnicliff G., Rick J.T. and Kerkut G.A., (1973) Biochemical and pharmacological actions of imidazoleacetic acid. *Biochem Pharmacol* 22, 535-542.

Cohen G. (1988) Oxygen radicals and Parkinson's disease. In *Oxygen Radicals and Tissue Injury*. Halliwell, B. (eds) FASEB, Bethesda Maryland, pp. 130-135.

Coulombe J.T., Kammerer B.L., Levy H.L., Hirsch B.Z. and Scriver C.R., (1983) Histidinaemia. Part III: Impact; a prospective study. *J Inherited Metab Dis* 6, 58-61.

Dhanam M., Radhakrishnan N.A., (1976) Comparative studies on histidase: Distribution in tissues, properties of liver histidase an its development in rat. *Indian J Exp Biol* 14, 103-106.

Dizdaroglu M., (1993) Measurement of radiation-induced damage to DNA at the molecular level. *Int. J. Radiat. Biol* 61, 175-183.

Duncan J.S., Brown P. and Marsden C.D., (1991) Progressive myoclonus and histidinaemia. *Mov Disord* 6, 87-89.

Dutra-Filho C.S., Wannmacher C.M., Pires R.F., Gus G., Kalil A.M. and Wajner M., (1989) Reduced locomotor activity of rats under histidine administration. *J. Nutr* 119, 1223-1227.

Erickson M.C., Hultin H.O., (1992) Influence of histidine on lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* 292, 427-432.

Esterbauer H. and Cheeseman K.H., (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth Enzymol* 186, 407-421.

Forfia P.R., Hintze T.H., Wolin M.S and Kaley G., (1999) Role of nitric oxide in the control of mitochondrial function. *Adv Exp Med Biol* 471, 381-388.

Freed W.J., Gillin J.C. and Wyatt R.J., (1980) Anomalous behavioral response to imidazoleacetic acid, a GABA agonist, in animals treated chronically with haloperidol. *Biol. Psychiatry* 15, 21-35.

Fridovich I., (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem* 64, 97-112.

Ghadimi H., Partington M.V. and Hunter A, (1962) Inborn error of histidine metabolism. *Pediatrics* 29, 714-728.

Ghadimi H., Partington M.W., Hunter A., (1961) A familial disturbance of histidine metabolism. *New Eng J Med* 265, 221-224.

Gonzalez-Flecha B., Llesuy S., Boveris A., (1991) Hidroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Rad. Biol. Med.* 10, 93-100.

Gruener N., Gozlan O., Goldstein T., Davis J., Besner I. and Iancu T.C. (1991) Iron, transferrin and ferritin in cerebrospinal fluid of children. *Clin Chem* 37, 263-265.

Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., (1985) Oxygen radicals and nervous system. *Trends Neurosci* 8, 22-26.

Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., (1986) Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 246, 501-514.

Haliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford Univ. Press, Oxford, UK.

Halliwell B. (1992) Reactive oxygen species and central nervous system. *Journal of Neurochemistry* 59, 1609-1623.

Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., (1999) Free radicals in biology and medicine, 3rd ed. New York, Oxford University Press.

Halliwell B., (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases, therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & Aging* 18, 685-716.

Harman D., (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol* 2, 298-300.

Hipkiss A.R., Preston J.E., Himswoth D.T.M., Worthington V.C. and Abbot N.J., (1997) Protective effects of carnosine against malondialdehyde-induced toxicity towards cultured rat brain endothelial cells. *Neuroscience Letters* 238, 135-138.

Honns A.J., Higgs A. and Moncada S., (1999) Inhibition of nitric oxide synthase as potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 191-220.

Johnston G.A., (2002) Medicinal chemistry and molecular pharmacology of GABA (C) receptors. *Curr Top Med Chem* 2, 903-913.

Kammeyer A., Eggelte T.A., Bos J.D. and Teunissen M.B.M., (1999) Urocanic acid isomers are good hydroxyl radical scavengers: a comparative study with structural analogues and with uric acid. *Bioch Biophys Acta* 1428, 117-120.

Kostka P., (1995) Free radicals (nitric oxide). *Anal Chem* 67, 411-416.

La Du B.N., Howell R.R., Jacoby G.A., Seegmiller J.E. and Zannoni, V.G., (1962) The enzymatic defect in histidinemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 7, 398-402.

LeBel C.P. and Body S.C., (1991) Oxygen Radicals: common mediators of neurotoxicity. *Neurotoxicol Teratol* 13, 341-346.

Lee S.C. and Yin S.J., (1976) Thin-layer separation of imidazole compounds and its application to radiotracing studies brain histidine metabolism. *J. Chromatogr* 129, 482-487.

Levy H.L., Shih V.E. and Mandigan P.M., (1974) Routine newborn screening for histidinemia. Clinical and biochemical results. *N Engl J Med* 291, 1214-1219.

Levy, H.L., (1989) Disorders of histidine metabolism. In *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*, Scriver, C.R., Beaudet, A .L., Sly, W.S. and Valle D. (eds): New York, McGraw-Hill, 6th edition pp. 563-579.

Levy, H.L., Taylor, R.G. and McInnes, R.R., (1995) Disorders of histidine metabolism. In *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*, Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (eds) New York, McGraw-Hill, 7th edition pp. 1107-1123.

Levy, H.L., Taylor, R.G. and McInnes, R.R., (2001) Disorders of histidine metabolism. In *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*, Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (eds) New York, McGraw-Hill, 8th edition pp. 1807-1820.

Lissi E., Pascual C. and Del Castillo M.D., (1992) Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) thermolysis. *Free Rad. Res. Comm* 17, 299-311.

Lowry O.H., Rosebrough N. J., Farr A.L. and Randall R.J., (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The J. Biol. Chem* 193, 265-267.

MacMillan V., (1982a) The effects of imidazole-4-acetic acid on cerebral indole amine metabolism. *Can J Physiol Pharmacol* 60, 308-312.

MacMillan V., (1982b) The effects of imidazole-4-acetic acid upon the energy metabolism of normoxic and hypoxic rat brain. *Brain Research* 232, 439-448.

Marcus R.J., Winters W.D., Roberts E. and Simonsen D.G., (1971) Neuropharmacological studies of imidazole-4-acetic acid actions in the mouse and rat. *Neuropharmacology* 10, 203-215.

Marklund, S.L. (1985) Pyrogallol Autoxidation. In *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton pp. 243-247.

McCord J.M. and Fridovich I., (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244, 6049-6055.

Morrison H., (1985) Photochemistry and photobiology of urocanic acid. *Photodermatology* 2, 158-165.

Niki, E., (1993) Antioxidant defenses in eucariotic cells: An overview. In *Free Radicals from Basic Science to Medicine*, Poli, G., Albano, E. and Dianzani, M.U. (eds). pp. 365-373.

Norval M., Simpson T.J. and Ross J.A., (1989) Urocanic acid and immunosuppression. *Photochem Photobiol* 50, 267-275.

Obata T. and Inada T., (1999) Protective effect of histidine on MPP⁺-induced hydroxyl radical generation in rat striatum. *Brain Res* 817, 206-208.

Obata T. and Yamanaka Y., (2000) Protective effect of histidine on potassium depolarization enhances 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced hydroxyl radical generation in the rat striatum. *Life Science* 68, 689-697.

Obata T., Aomine M. and Yamanaka Y., (1999) Protective effect of histidine on iron (II)-induced hydroxyl radical generation in rat hearts. *J Physiol* 93, 213-218.

Obata T., Kubota S. and Yamanaka Y., (2001) Protective effect of histidine on para-nonylphenol-enhanced hydroxyl free radical generation induced by 1-methyl-4-phenylpyridium ion (MPP+) in rat striatum. *Biochim Biophys Acta* 1568, 171-175.

Oga, S., (1996) In *Fundamentos de Toxicologia*. Livraria Atheneu, São Paulo, pp. 39-57.

Oya Y. and Yamamoto K., (1988) The biological activity of hydrogen peroxide. IV. Enhancement of its clastogenic actions by coadministration of L-histidine. *Mutation Res* 198, 233-240.

Oya-Ohta Y., Ueda A., Ochi T., Harada M. and Yamamoto K., (2001) The biological activity of hydrogen peroxide VII. L-Histidine increases incorporation of H₂O₂ into cells and enhances formation of 8-oxodeoxyguanosine by UV-C plus H₂O₂ but not H₂O₂ alone. *Mut Res* 478, 119-127.

Prell G.D., Duoyon E., Sawyer W.F. and Morrishow A.M., (1996) Disposition of histamine, its metabolites, and pros-methylimidazoleacetic acid in brain regions of rats chronically infused with α -fluoromethylhistidine. *J Neurochem* 66, 2153-2159.

Prell G.D., Morrishow A.M., Duoyon E. and Lee W.S., (1997) Inhibitors of histamine methylation in brain promote formation of imidazoleacetic acid, which interacts with GABA receptors. *J Neurochem* 68, 142-151.

Pryor W.A., (1978) The formation of free radicals and the consequences of their reactions in vivo. *Photochem Photobiol* 28, 787-790.

Qian H. and Dowling J. E., (1994) Pharmacology of novel GABA receptors found on rod horizontal cells of the white perch retina. *J. Neurosci* 14, 4299-4307.

Reznick, A.Z. and Packer, L. (1993) Free radicals and antioxidant in muscular and neurological diseases and disorders. In *Free Radicals from Basic Science to Medicine*. Poli G., Albano E. and Dianzani M.U. (eds) Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland pp.425-437.

Roberts E. and Simonsen D.G., (1966) A hypnotic and possible analgesic effect of imidazoleacetic acid in mice. *Biochem Pharmacol* 15, 1875-1877.

Salim-Hanna M., Lissi E. and Videla L.A., (1991) Free radical scavenging activity of carnosine. *Free Radic Res Commun* 14, 263-270.

Scriver C.R. and Levy H.L., (1983) Histidinaemia. Part I: Reconciling retrospective and prospective findings. *J Inherited Metab Dis* 6, 51-53.

Shaw K.N.F., Boder E., Gutenstein M. and Jacobs E.E., (1963) Histidinemia. *J Pediatr* 63, 720-721.

Skoner D.P., Gentile D.A., Fireman P., Cordoro K. and Doyle W.J., (2001) *Ann Allergy Asthma Immunol* 87, 303-306.

Stadtman E.R. and Oliver C.N., (1991) Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem* 266, 2005-2008.

Starke-Reed P.E. and Oliver C.N., (1989) Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 275, 559-567.

Stifel F.B. and Herman R.H., (1971) Histidine metabolism. *Am J Clin Nutr* 24, 207-217.

Tachon, P. and Giacomoni, P.U. (1988) L-Histidine is a clastogenic factor. In *Light in biology and medicine*, RH Douglas, J Moan, F Dall'Acqua (eds), New York: Plenum pp. 211-217.

Tachon P. and Giacomoni P.U., (1989) Histidine modulates the clastogenic effect of oxidative stress. *Mut Res* 211, 103-109.

Tanabe M. and Sakura N., (1989) Hyperhistaminemia in patients with histidinemia due to increased decarboxylation of histidine. *Clin Chim Acta* 186, 11-17.

Tappel, A.L., (1975) Lipid peroxidation and fluorescent molecular damage to membranes. In *Pathobiology of Cell Membranes*, Trump, B. F. and Arstila, A.U. (eds) Academic, New York, pp. 145-170.

Thomas B. and Prell G.D., (1995) Imidazoleacetic acid, gamma-aminobutyric acid receptor agonist, can be formed in rat brain by oxidation of histamine. *J Neurochem* 65, 818-826.

Tunncliffe G., (1976) Centrally-acting drugs and the formation of brain γ -aminobutyric acid. *Gen Pharmac* 7, 259-262.

Tunncliffe G., (1998) Pharmacology and function of imidazole 4-acetic acid in brain. *Gen Pharmacol* 31, 503-509.

Von Sonntag C., (1987) *The chemical basis of radiation biology*. London: Taylor and Francis.

Wadman S.K., Van Sprang F.J., Van Stekelenburg G.J. and De Bree P.K., (1967) Three new cases of histidinemia. Clinical and biochemical data. *Acta Paediatr Scand* 56, 485-492.

Wadman S.K., De Bree P.K., Van der Heiden C. and Van Sprang F.J., (1971) Automatic column Chromatographic analysis of urinary and serum imidazoles in patients with histidinaemia and normals. Clin Chim Acta 31, 215-224.

Wendel A., (1981) Glutathione Peroxidase. Meth Enzymol 77, 325-332.

Youdim, M.B.H., (1988a) Brain Iron. Neurochemical and Behavioral Aspects. Taylor and Francis. New York and Philadelphia.

Youdim M.B.H., (1988b) Iron in the brain: implications for Parkinson's and Alzheimer's diseases. Mt Sinai J Med. 55, 97-101.

VI. ANEXOS

A carnosina é um dipeptídeo derivado da histidina conhecido como neuroprotetor endógeno contra radicais livres (Boldyrev et al., 1997). Nesta parte do trabalho, foi testado o efeito *in vitro* da carnosina sobre parâmetros de estresse oxidativo em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

A figura VII.1 mostra que a carnosina nas concentrações de 1, 2,5, 5 e 10 mM não altera o TRAP [$F(4,25)=0,37$; $p>0,05$]. Estes resultados estão de acordo com outros autores que já descreveram que a carnosina, em concentrações de até 17 mM, não produz efeitos significativos sobre o TRAP (Salim-Hanna et al., 1991).

A figura VII.2 mostra que a carnosina em concentrações de 1 a 10 mM diminui a quimioluminescência de uma maneira dose-dependente [$F(4,25)=36,68$; $\beta=-0,89$; $p<0,001$], confirmando o efeito neuroprotetor da carnosina (Boldyrev et al., 1997).

A figura VII.3 mostra que a carnosina nas concentrações de 5 e 10 mM diminui a medida de TBA-RS [$F(4,25)=36,86$; $p<0,001$], também de uma maneira dose-dependente ($\beta=-0,86$; $p<0,001$). Este resultado, juntamente com o anterior, demonstra que a carnosina tem efeito protetor contra a lipoperoxidação *in vitro*.

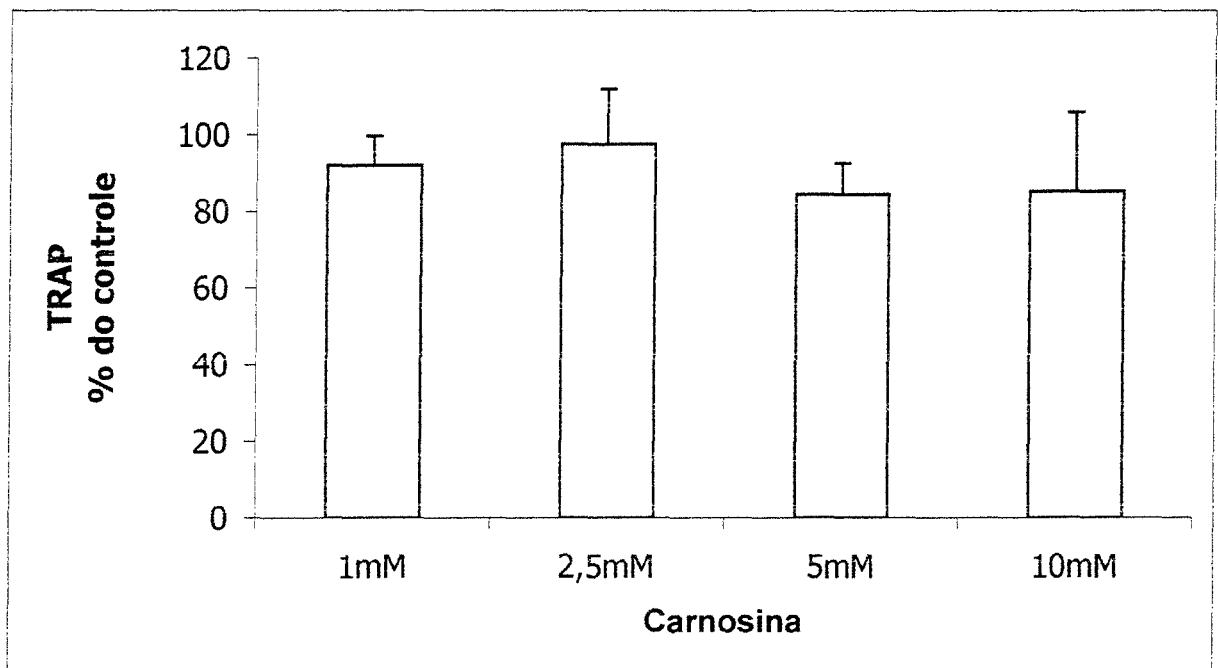


Figura VII.1 Efeito da carnosina nas concentrações de 1, 2,5, 5 e 10 mM sobre o TRAP em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Resultados expressos em média + erro padrão, representados em % do controle (n=6 ratos). Não houve diferença significativa em relação aos controles pela ANOVA.

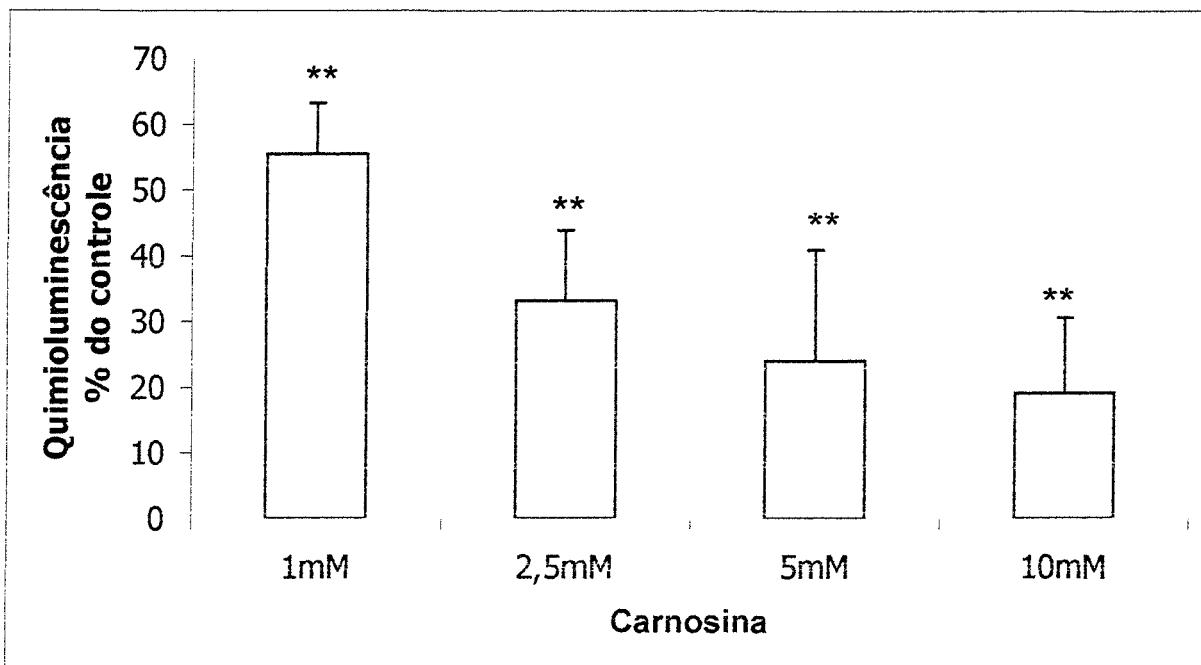


Figura VII.2 Efeito da carnosina nas concentrações de 1, 2,5, 5 e 10 mM sobre a quimioluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Resultados expressos em média + erro padrão, representados em % do controle (n=6 ratos). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Duncan (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

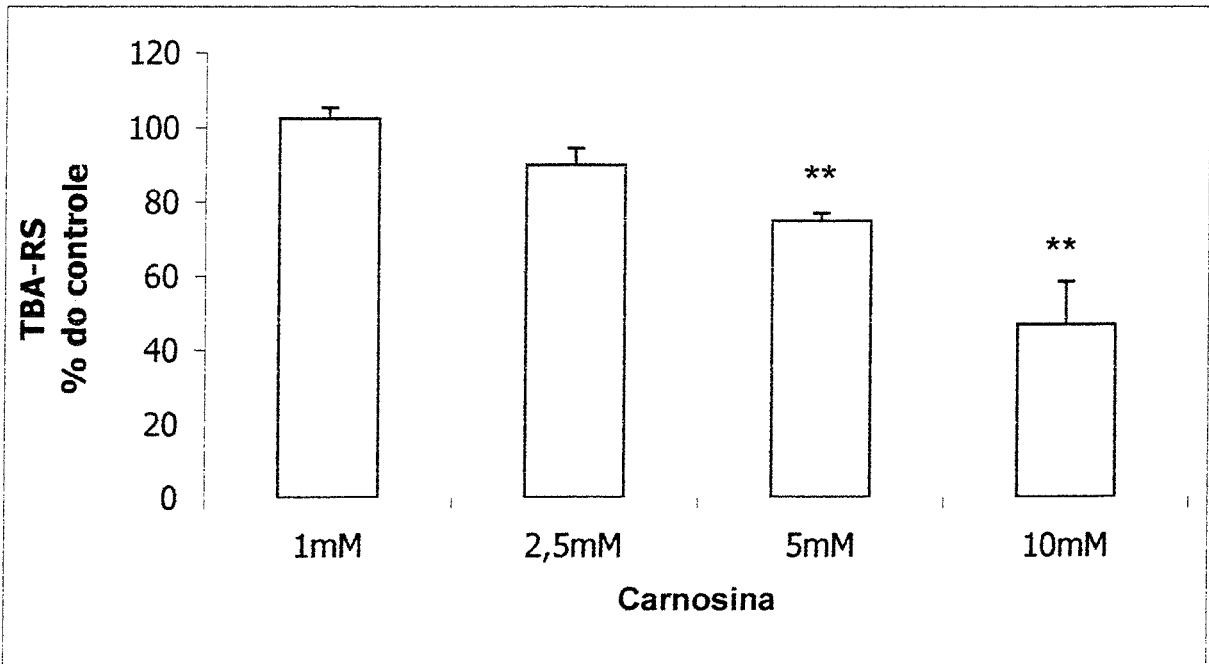


Figura VII.3 Efeito da carnosina nas concentrações de 1, 2,5, 5 e 10 mM sobre as TBA-RS em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Resultados expressos em média + erro padrão, representados em % do controle (n=6 ratos). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Duncan (**p< 0,01).