

Danúbia Bonfanti dos Santos

**EFEITOS DO PROBUCOL SOBRE A ENZIMA GLUTATIONA  
PEROXIDASE E SUA RELAÇÃO COM A NEUROPROTEÇÃO**

Tese submetida ao Programa de Pós  
graduação em Bioquímica da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Doutor em Bioquímica.  
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Farina

Florianópolis  
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Danúbia Bonfanti dos  
Efeitos do probucol sobre a enzima glutaciona  
peroxidase e sua relação com a neuroproteção [tese] /  
Danúbia Bonfanti dos Santos ; orientador, Marcelo Farina -  
Florianópolis, SC, 2012.  
105 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Probucol. 3. Glutaciona peroxidase. 4.  
Doença de Alzheimer. I. Farina, Marcelo . II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica. III. Título.

“Efeitos do Probuocol sobre a enzima glutatona peroxidase e sua  
relação com neuroproteção”

por

**DANÚBIA BONFANTI DOS SANTOS**

Tese julgada e aprovada em sua forma final  
pelos membros titulares da Banca  
Examinadora (Port. 21/PPGBQA/2012) do  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica  
- UFSC, composta pelos Professores  
Doutores:

Banca Examinadora

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Marcelo Farina (BQA/CCB/UFSC)**

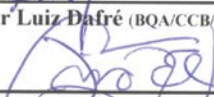
  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Flávia Carla Meotti (Instituto de Química/USP)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Nilda Berenice de Vargas Barbosa (Departamento de  
Química/CCNE/UFSC)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Rui Daniel Prediger (FMC/CCB/UFSC)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Carla Inês Tasca (BQA/CCB/UFSC)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Alcir Luiz Dafre (BQA/CCB/UFSC)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 29 de novembro de 2012

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais...  
... Por todo amor, carinho, apoio e  
confiança.*

*Ao meu amor ( Marcelo)...  
... Por me apoiar nas horas difíceis,  
sendo companheiro e amigo.*

*Ao professor Marcelo Farina, meus  
sinceros agradecimentos pela  
oportunidade de fazer parte de seu grupo  
de pesquisa. Obrigada pela paciência,  
dedicação e pela oportunidade de  
aprendizado. Também pelo exemplo de  
determinação, amizade e por me apoiar no  
crescimento profissional.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades e principalmente pela vida.

Aos meus pais Paulo e Inês pelo amor, incentivo, compreensão em todos os momentos. Vocês foram fundamentais para que eu conseguisse vencer mais essa etapa.

A toda minha família em especial aos meus irmãos Débora, Dani e Diógenes por sempre estarem torcendo por mim.

Ao meu orientador Marcelo Farina por ter aberto as portas do laboratório para mim, pela disponibilização do espaço físico, pela contribuição que deu para a realização do trabalho e, principalmente, por tudo o que representou na minha formação.

Sou grata as minhas grandes amigas que me ensinaram e me ajudaram muito, tanto no laboratório como na vida pessoal Dirleise e Renata! A Dirleise, companheira no trabalho e na vida, que desde IC já era uma dupla perfeita! Agradeço também a Mariana, minha nova colega, pela amizade e ajuda na realização desse trabalho. Agradeço minha amiga querida Elidiane (*in memoriam*) que sempre torceu por mim!

E aos colegas de laboratório: Alessandra, Aline, Dirleise, Eduardo, Juliana, Mariana, Renata, Luciana, Carol e Viviane e a todos os outros pela amizade, companheirismo e parceria em momentos importantes, muito obrigada! Aos amigos que estão longe, mas que guardo um carinho especial Daia, Vivi, Marinei, e Cassi. As amigas e colaboradoras: Morgana, Josiane, Andrea e Vanessa! A Cris pelas conversas no corredor e amizade! A Kaite nossa IC querida e companheira nos finais de semana no laboratório. Ao Eduardo pelas ajudas, trocas de idéias e colaborações. Agradeço também a Ale pela companhia e por dividir as despesas durante anos.

Aos colegas e amigos dos laboratórios vizinhos: Bianca, Jade, Marcos, Gianni, Lara, Daia, Vicente, Suelen, Débora, Filipe, Tanara, Mark, Aline (Vizi), Roberta, Vivi, Luiz, Mari e demais colegas...

A professora Cláudia pela amizade e ajuda na realização desse trabalho! A professora Rita que me acolheu em seu laboratório durante meu estágio de doutorado sanduíche. Aos colaboradores, professores Rui e Jamil por essa oportunidade.

Ao professor João e professora Nilda por fazerem parte dessa caminhada.

Também agradeço aos professores: Andreza, Néelson, Alexandra, Carla, Alcir, Ana Lúcia, Cláudia, Rodrigo e Bóris e aos colegas do laboratório pela amizade.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela possibilidade de realização deste curso.

Aos professores da banca, pela disponibilidade em fazer a leitura desta tese e compor a banca examinadora. Também aos técnicos e amigos dessa universidade: Bibi, Chirle e Dênis.

Aos professores do curso, ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica e a CAPES, pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos.

E a todos que de certa forma colaboraram para realização desse trabalho, o meu muito obrigado!





## RESUMO

O probucol é um composto antilipidêmico que apresenta propriedades anti-inflamatória e antioxidante em diferentes modelos experimentais de neurotoxicidade/neuropatologia. O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de explorar o possível efeito protetor deste fármaco sobre o modelo experimental da doença de Alzheimer (DA), além de tentar elucidar seu mecanismo de proteção através de experimentos *in vitro* e *in vivo*. A DA é uma condição neurodegenerativa, caracterizada por perda cognitiva e alterações no comportamento, e o mecanismo de neurodegeneração na DA parece estar relacionado com o processo de estresse oxidativo. Inicialmente, foi avaliado o possível efeito protetor do probucol contra a neurotoxicidade induzida pela administração intracerebroventricular (i.c.v.) do peptídeo  $\beta$ -amilóide 1-40 ( $A\beta_{1-40}$ ) em camundongos através de parâmetros comportamentais, bioquímicos e imuno-istoquímicos. A administração do  $A\beta_{1-40}$  resultou em danos na memória e aprendizado dos animais, bem como diminuição nos níveis de sinaptofisina e aumento na atividade da acetilcolinesterase (AChE) hipocampal. O tratamento com probucol (10 mg/kg/dia, durante 2 semanas) atenuou os efeitos deletérios causados pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$ , como danos cognitivos e bioquímicos (aumento da peroxidação lipídica e da atividade da enzima acetilcolinesterase; e perda sináptica) no hipocampo dos animais. Estudos anteriores demonstraram que o probucol pode aumentar a atividade da enzima antioxidante glutationala peroxidase (GPx), envolvida na detoxificação de peróxidos intracelulares. Assim, com o objetivo de investigar os efeitos do probucol sobre a atividade e expressão desta enzima ensaios *in vitro* e *in vivo* foram realizados. O probucol (10  $\mu$ M) foi capaz de aumentar significativamente a atividade da GPx em cultura de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), embora não tenha aumentado a quantidade dessa proteína. Além disso, o tratamento com probucol (3 e 10  $\mu$ M) protegeu as células SH-SY5Y da citotoxicidade e da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) induzida por hidroperoxido orgânico. Da mesma forma, camundongos tratados com probucol (10 mg/kg/dia, durante 5 semanas) mostraram um aumento na atividade da GPx no fígado, rim, coração e hipocampo, mas os níveis da enzima não foram alterados nesses tecidos. Por fim, os estudos enzimáticos com a GPx-1 purificada mostraram que o probucol (10 e 30 nM) foi capaz de modular positivamente a atividade dessa enzima, aumentando a velocidade máxima ( $V_{max}$ ) quando foi utilizado um gradiente de concentração de glutationala (GSH) ou de *tert*-butilhidroperoxido

(*t*BuOOH); enquanto que valores de  $K_M$  não foram modificados. Em conjunto, os dados aqui apresentados mostram, pela primeira vez, que o probucol é capaz de aumentar diretamente a  $V_{max}$  da GPx-1. Considerando que (i) o probucol mostrou um papel protetor em um modelo experimental da DA, que (ii) o composto preveniu a morte celular induzida por peróxidos e aumentou a atividade da GPx-1 *in vitro* e *in vivo*, e que (iii) esta enzima apresenta um importante papel na patofisiologia de condições neurodegenerativas. Nesse contexto, o presente estudo apresenta um novo alvo e mecanismo de ação para um “antigo fármaco”, onde a modulação da atividade da GPx pode representar uma importante estratégia terapêutica.

Palavras-chave: Probucol, Glutathiona peroxidase, doença de Alzheimer, antioxidante.

## ABSTRACT

Probucol is a lipid-lowering agent with anti-inflammatory and antioxidant properties, which plays protective effects in experimental models of neurotoxicity/neuropathology. The present study was aimed to explore the possible protective effect of this drug on experimental model of Alzheimer's disease (AD), and attempt to elucidate its mechanism of protection through *in vitro* and *in vivo* experiments. AD is a neurodegenerative disorder characterized by cognitive impairment and behavioral changes, and the mechanisms of neurodegeneration of this disease appear to be related to the process of oxidative stress. Initially, we evaluated the possible protective effect of probucol against the neurotoxicity induced by intracerebroventricular (icv) administration of  $\beta$ -amyloid peptide 1-40 ( $A\beta_{1-40}$ ) in mice through behavioral, biochemical and immunohistochemical parameters. The administration of  $A\beta_{1-40}$  resulted in damage to the memory and learning of animals, as well as decreased levels of synaptophysin and increased acetylcholinesterase (AChE) activity in hippocampus. Treatment with probucol (10 mg/kg/day, for 2 weeks) attenuated the deleterious effects caused by the peptide  $A\beta_{1-40}$ , such as cognitive impairment and biochemical changes (increased acetylcholinesterase activity, lipid peroxidation and synaptic loss in the hippocampus). Previous studies have shown that probucol may increase the activity of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GPx), involved in the detoxification of intracellular peroxides. Thus, in order to investigate the effects of this phenolic compound on the expression and activity of the GPx *in vitro* and *in vivo* experiments were performed. Probucol (10  $\mu$ M) significantly increased GPx activity in *in vitro* experiments with cultured human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) without increasing the amount of this protein. Furthermore, treatment with probucol (3 and 10  $\mu$ M) protected against SH-SY5Y cells cytotoxicity and production of reactive oxygen species (ROS) induced by organic hydroperoxide. Similarly, mice treated with probucol (10 mg/kg/day, for 5 weeks) showed an increase in the GPx activity in liver, kidney, heart and hippocampus, but the enzyme levels were not altered in these tissues. Finally, the enzymatic studies with purified GPx-1 showed that probucol (10 and 30 nM) was able to positively modulate the activity of this enzyme by increasing the maximum velocity ( $V_{max}$ ) when a concentration gradient of glutathione (GSH) or *tert*-butyl hydroperoxide (*t*BuOOH) was used, while  $K_M$  values were not modified. Taken together, these data show for the first time that probucol is capable of directly increasing the  $V_{max}$  of GPx-1,

and this event is probably related to the increased GPx-1 activity in cell culture and in mice. Taking into account that (i) probucol showed a neuroprotective role in an experimental model of AD, (ii) the compound prevented cell death induced by peroxides and increased the activity of GPx-1 *in vitro* and *in vivo*, and (iii) this enzyme has an important role in the pathophysiology of neurodegenerative diseases.. In this scenario, this study represents a new target and mechanism of action for an "old drug", where the modulation of its activity may represent an important therapeutic strategy.

**Keywords :** Probucol, Glutathione peroxidase, Alzheimer's disease, antioxidant.

## LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE FIGURAS DA TESE

**Figura 1:** Estrutura química do probucol 18

**Figura 2:** Geração do peptídeo  $\beta$ -amilóide 22

### LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO I

**Figura 1:** Probucol (PB) reduces plasma cholesterol levels in mice 94

**Figura 2:** Probucol (PB) attenuates cognitive impairment induced by  $A\beta_{1-40}$  in mice 95

**Figura 3:** Probucol (PB) prevents  $A\beta_{1-40}$  induced synaptic disruption in mice 96

**Figura 4:** Probucol (PB) prevents the increase of AChE activity induced by  $A\beta_{1-40}$  in the hippocampus of mice 97

**Figura 5:** Probucol (PB) prevents the decrease in glutathione reductase (GR) activity induced by  $A\beta_{1-40}$  in the hippocampus of mice 97

### LISTA DE FIGURAS E TABELA DO CAPÍTULO II

**Figura 1:** Effect of probucol on GPx activity in cultured human neuroblastoma cells 59

**Figura 2:** Effect of probucol on the peroxide-induced cytotoxicity in human neuroblastoma cells 59

**Figura 3:** Effect of probucol on *t*BuOOH-induced reactive oxygen species (ROS) production in cultured human neuroblastoma cells 60

**Figura 4:** Effect of probucol on GPx expression in cultured human neuroblastoma cells 60

**Figura 5:** Effect of probucol on GPx activity in liver (A), kidney (B), heart (C) and hippocampus (D) from mice 61

**Figura 6:** Effect of probucol on GPx-1 expression in liver (A), kidney (B), heart (C) and hippocampus (D) from mice 62

**Figura 7:** Effect of probucol on purified GPx-1 activity 63

**Figura 8:** Effect of probucol on purified GPx-1 activity in the presence of inhibitor 64

**Table 1:** Kinetic parameters: maximum velocities ( $V_{max}$ ), Michaelis constants ( $K_M$ ) calculated by GSH and *t*BuOOH concentration gradients 65

## LISTA DE ABREVIATURAS

A $\beta$  - Peptídeo  $\beta$ -amilóide  
 A $\beta$ <sub>1-40</sub> - Peptídeo  $\beta$ -amilóide fragmento de 40 aminoácidos  
 A $\beta$ <sub>40-1</sub> - Peptídeo  $\beta$ -amilóide fragmento de 40 aminoácidos reverso  
 AChE - Acetilcolinesterase  
 3-NP - ácido 3- nitropropiónico  
 Apo E - Apolipoproteína E  
 APP - Proteína precursora amilóide  
 AQ - Ácido quinolínico  
 BACE -  $\beta$ -secretase  
 CuOOH - Peróxido de cumene  
 DA - Doença de Alzheimer  
 ERO - Espécies reativas de oxigênio  
 GPx - Glutaciona peroxidase  
 GPx-1 - Glutaciona peroxidase isoforma 1  
 GPx-4 - Glutaciona peroxidase isoforma 4  
 GPx-1 - GPx-4 - Diferentes isoformas da enzima glutaciona peroxidase  
 GR - Glutaciona redutase  
 GSH - Glutaciona  
 HDL - Lipoproteína de alta densidade  
 HMG-COAr - HMG-COA redutase  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio  
 i.c.v. - intracerebroventricular  
 i.p. - intraperitoneal  
 K<sub>M</sub> - constante de Michaelis e Menten  
 LDL - Lipoproteína de baixa densidade  
 LRP-1 - Receptor relacionado à lipoproteína de baixa densidade  
 NMDA - N-metil-D-aspartato  
 PSEN - Presenilina  
 PSEN-1 - Presenilina isoforma 1  
 PSEN-2 - Presenilina isoforma 2  
 SH-SY5Y - Células de neuroblastoma humano  
 SNC - Sistema nervoso central<sup>15</sup>  
 SOD - Superóxido dismutase  
 TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
*t*BuOOH - Peróxido de *tert*-butila  
*V*<sub>max</sub> - Velocidade máxima

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1. Probucol.....	17
1.1.1. Histórico.....	17
1.1.2. Propriedades farmacológicas.....	18
1.2. Glutaciona Peroxidase.....	19
1.2.1. Glutaciona peroxidase-1: características, localização e ação.....	19
1.3. Doença de Alzheimer.....	20
1.3.1. Modelos Experimentais da doença de Alzheimer.....	24
1.3.2. Tratamento da doença de Alzheimer.....	25
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
2.1. Objetivos gerais.....	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
3.1. Apresentação.....	29
3.2. Capítulo I.....	31
3.3. Capítulo II.....	33
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>
<b>6. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>75</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>91</b>
8.1. Artigo científico (Capítulo I).....	91
8.2. Resultados preliminares (doutorado sanduíche).....	100



# 1. INTRODUÇÃO

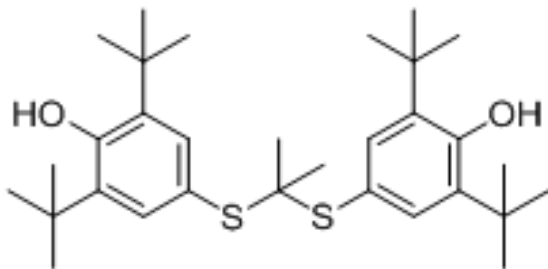
## 1.1 PROBUCOL

### 1.1.1 *Histórico*

O probucol é um composto fenólico que foi desenvolvido nos Estados Unidos pela *Consolidation Coal Company* em 1970 (Figura 1). Inicialmente, este composto foi utilizado como antioxidante durante o processo de fabricação de borracha. Posteriormente, as propriedades biológicas do probucol foram descritas por bioquímicos da empresa *Dow Chemical Company*, os quais verificaram os efeitos do mesmo sobre a redução dos níveis plasmáticos de colesterol (Barnhart e cols., 1970).

Este composto tem uma longa história de aplicação clínica com eficácia estabelecida e perfis de segurança. Entretanto, em 1995, vários países interromperam o uso clínico do probucol em decorrência dos efeitos colaterais desta substância. Neste período, 18 anos após a introdução do produto na clínica, as agências controladoras retiraram o probucol do mercado, devido ao efeito do mesmo sobre a redução dos níveis plasmáticos da lipoproteína de alta densidade (HDL) e também devido à ocorrência de arritmias ventriculares nos usuários deste composto (Tardif e cols., 2002). Apesar da demonstração de efeitos colaterais, as propriedades farmacológicas do probucol continuam sendo avaliadas em diversos estudos clínicos no mundo (Poirier, 2005; Yamamoto, 2008), e o mesmo é utilizado clinicamente no Japão desde 1985, sendo que atualmente pelo menos 60 mil pacientes japoneses utilizam esse composto como medicamento. Estudos toxicológicos adicionais são necessários para eventualmente reposicionar o probucol como uma substância terapêutica, visto que os dados disponíveis acerca dos efeitos colaterais são contraditórios (Tardif e cols., 2002, Tardif e cols., 2003; Yamashita e cols., 2008).

Alguns derivados do probucol estão sendo testados em estudos pré-clínicos como, por exemplo, o succinobucol. O succinobucol é um éster monosuccínico derivado do probucol que tem apresentado propriedades farmacológicas e eficácia terapêutica semelhantes ao probucol. No entanto, o succinobucol não causou os efeitos colaterais evidenciados em indivíduos que receberam o probucol (Sundell e cols., 2003; Kunsch e cols., 2004; Meng e cols., 2004; Tanous e cols., 2008).



**Figura 1.** Estrutura química do probucol.

### 1.1.2 *Propriedades farmacológicas*

A principal indicação terapêutica do probucol está associada a sua ação hipocolesterolemizante (Barnhart e cols., 1970). O mecanismo de ação para esse efeito ainda não está bem elucidado. Porém, vários mecanismos para explicar esta ação farmacológica (redução do colesterol plasmático) desse composto estão sendo propostos e, dentre eles, destaca-se o aumento da excreção do colesterol pela via biliar (Tawara e cols., 1986). Michihara e colaboradores (2003) sugeriram que o fármaco pode diminuir a expressão de uma das enzimas responsável pelas fases iniciais da biossíntese do colesterol (pirofosfomevalonato descarboxilase), além de reduzir a absorção do colesterol proveniente da dieta. Além disso, o probucol parece estar envolvido no aumento da síntese e secreção da apolipoproteína E (ApoE) e na regulação da expressão do receptor relacionado à lipoproteína de baixa densidade (LRP-1) (Champagne e cols., 2003; Poirier e cols., 2003).

Entre as suas indicações, o probucol está sendo utilizado para o tratamento da arterosclerose, e conseqüentemente, está sendo efetivo na prevenção de doenças cardiovasculares (Yamashita e Matsuzawa, 2009). Estudos experimentais e clínicos têm mostrado que o probucol diminui a progressão da aterosclerose (Regnstrom e cols., 1996), protege a vasculatura (Poirier, 2003), inibe a trombose (Tanous e cols., 2006) e atua como uma molécula antioxidante (Liu e cols., 2000, Singla e cols., 2007). Além disso, Kaminnyi e colaboradores (2007) verificaram que o tratamento por via oral com baixas doses (250 mg/dia) de probucol produz significativos efeitos antioxidantes (como o aumento da atividade da GPx) e reduz os produtos de oxidação por radicais livres no sangue de pacientes com doença arterial coronariana.

Além das propriedades sobre o sistema cardiovascular, estudos utilizando animais de laboratório sugerem que o probucol aumenta a neurogênese (Champagne e cols., 2003), modula a atividade antioxidante (Farina e cols., 2009) e possui propriedades anti-inflamatórias (Pfuetze e Dujovne, 2000). Neste contexto, Farina e colaboradores mostraram que o probucol é capaz de modular positivamente a atividade da enzima glutathione peroxidase-1 (GPx-1) em cultura primária de neurônios cerebelares, sendo que este fenômeno foi responsável pela proteção contra o dano oxidativo induzido por metilmercúrio (Farina e cols., 2009), um agente tóxico que induz elevada produção de peróxido de hidrogênio (Franco e cols., 2007), associado a uma detoxificação deficiente (Farina e cols., 2003). Um recente estudo do nosso grupo de pesquisa evidenciou que o probucol foi efetivo em reduzir o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial induzidos pelo ácido quinolínico (AQ), ácido 3-nitropropiónico (3-NP) e pelo modelo combinado (AQ + 3-NP) em modelo experimental da doença de Huntington em fatias de estriado de ratos (Colle e cols., 2012).

## 1.2. GLUTATHIONE PEROXIDASE (GPX)

As GPxs compreendem uma família de enzimas conhecidas por serem importantes componentes do sistema de defesa antioxidante humano. Nos seres humanos, foram descritas até o presente momento cinco isoformas de enzimas GPxs: citosólica (GPx-1), gastrointestinal (GPx-2), plasmática (GPx-3), fosfolipídica (GPx-4), e a do epitélio olfativo e específica do tecido embrionário (GPx-6) (Kryukov e cols., 2003). As isoformas da GPx 1-3 catalisam a redução de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos, enquanto que a GPx-4 pode reduzir diretamente hidroperóxidos de fosfolipídios e colesterol (Ursini e cols., 1999).

### ***1.2.1. Glutathione peroxidase-1 : características, localização e ação***

A GPx-1 (EC 1.11.1.9) é a isoforma mais abundante da família das GPxs, e foi caracterizada pela primeira vez em 1957 como uma enzima eritrocitária capaz de proteger a hemoglobina de dano oxidativo (Mills, 1957). Análises posteriores revelaram a presença de um mineral traço essencial, o selênio, sob a forma do aminoácido selenocisteína, que é essencial para a atividade desta enzima (Flohé e cols., 1973; Rotruck e cols., 1973; Kraus e cols., 1983). A GPx-1 é uma proteína

homotetrâmera com 4 subunidades de aproximadamente 21–23 kDa (Flohé e cols., 1971; Miwa e cols., 1983), sendo que seus monômeros em humanos apresentam 202 e 204 aminoácidos (Lubos e cols., 2011).

A GPx-1 é uma enzima antioxidante envolvida na prevenção dos efeitos nocivos do peróxido de hidrogênio intracelular e outros peróxidos orgânicos (Lubos e cols., 2011). Ela está presente em todas as células eucariontes, sendo encontrada no citosol, mitocôndrias e, em algumas células, nos peroxissomas (Utsunomiya e cols., 1991; Singh e cols., 1994; Esworthy e cols., 1997;). Esta enzima parece ser mais eficaz do que a catalase na remoção intracelular de peróxidos sob determinadas condições fisiológicas (Cohen e Hochstein, 1963; Antunes e cols., 2002). Além disso, evidências apontam para o envolvimento da GPx-1 em condições de estresse oxidativo relacionadas a doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer (Tabner e cols., 2005; Power e Blumbergs, 2009; Gardaneh e cols., 2011) .

### 1.3. DOENÇA DE ALZHEIMER

A doença de Alzheimer (DA) foi descrita inicialmente pelo médico alemão Alois Alzheimer, em 1906. Alzheimer definiu seu achado como uma patologia neurológica, não reconhecida, que cursava com demência, destacando os sintomas de prejuízo cognitivo, alterações de comportamento e incapacidade para as atividades rotineiras. Posteriormente, Alzheimer ainda descreveu os aspectos anatomopatológicos da doença, cujas principais características são o acúmulo de placas senis e de emaranhados neurofibrilares, além da perda neuronal (Moller e Graeber, 1998; Goedert e Spillantini, 2006).

A DA é uma neuropatologia multifatorial resultante de uma combinação de fatores ambientais e genéticos. A forma esporádica da doença representa cerca de 90-95% dos casos, onde estão envolvidos principalmente os fatores ambientais e o avanço da idade, ocorrendo geralmente após os 65 anos (Poirier, 2005). Além do envelhecimento, que constitui o principal fator de risco associado à doença, outros fatores têm sido sugeridos com base em estudos epidemiológicos, como por exemplo: sexo feminino, depressão, diabetes mellitus, hipertensão arterial, tabagismo, hiperinsulinemia, inatividade física, dislipidemias, dieta composta por excesso de gorduras e diferentes fatores genéticos (Cotman e Berchtold, 2002; Ritchie e Lovestone, 2002; Mattson, 2003; Gorelick, 2004; Luchsinger e Mayeux, 2004).

Por outro lado, a forma familiar (ou genética) da DA tem herança autossômica dominante e o início dos sintomas clínicos

geralmente ocorre antes dos 65 anos de idade, sendo considerada a forma mais rara da doença (5–10% do total de casos) (Poirier, 2005). Os principais responsáveis pelos casos da forma familiar são: mutações em genes codificadores para a (a) proteína precursora do peptídeo  $\beta$ -amilóide (APP) e de outras proteínas associadas com a formação dos fragmentos tóxicos de amilóide, como (b) presenilina 1 (PSEN1) e (c) presenilina 2 (PSEN2), bem como da (d) Apo E (especificamente ao alelo  $\epsilon$ 4) e do (e) LRP-1. Todavia, mutações nesses genes, nos casos de doença esporádica, não estão descartadas (Levy-Lahad e cols., 1995; Sherrington e cols., 1995; Blennow e cols., 2006).

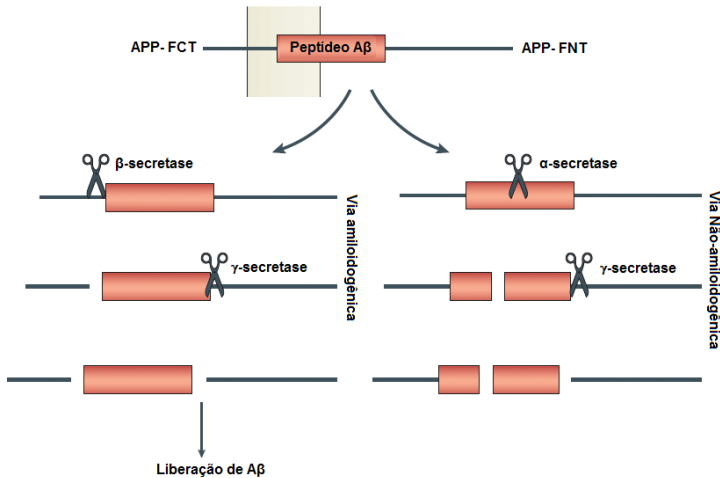
Ainda não foram identificados marcadores biológicos ou características clínicas que estabeleçam um diagnóstico definitivo e precoce para a DA. Dessa forma, o diagnóstico só pode ser obtido e confirmado com a demonstração de lesões neuropatológicas no cérebro de indivíduos *post mortem* (Gearing e cols., 1995). Do ponto de vista histopatológico, observa-se no cérebro de indivíduos com a DA atrofia cortical difusa, a presença de grande número de placas senis e de emaranhados neurofibrilares, degenerações grânulo-vacuolares e perda neuronal (Dickson, 1997; Braak e Braak, 1998; Uylings e De Brabander, 2002).

Os emaranhados neurofibrilares e as placas senis podem estar presentes normalmente em cérebros durante o envelhecimento, mas em menor quantidade e com distribuição menos extensa, quando comparados com os pacientes portadores de DA (Hardy e Higgins, 1992; Walsh e Selkoe, 2004). As placas senis e os emaranhados neurofibrilares encontram-se, principalmente, nas regiões do cérebro envolvidas no aprendizado, memória e comportamento emocional, como o córtex, hipocampo e amígdala (Mattson, 2004).

Os emaranhados neurofibrilares são constituídos primariamente de moléculas da proteína *Tau* associadas a microtúbulos. A proteína *Tau* confere estabilidade aos microtúbulos do citoesqueleto neural, sendo esta função regulada por um processo de fosforilação e desfosforilação. Nos neurônios que sofrem degeneração em pacientes com a DA, as proteínas *Tau* associadas aos microtúbulos tornam-se anormalmente hiperfosforiladas (Nagy e cols., 1995).

Por sua vez, as placas senis são depósitos principalmente extracelulares de fibrilas e agregados amorfos de peptídeo  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ ), o qual é composto principalmente por 40 ou 42 aminoácidos (Glennner e Wong, 1984). O A $\beta$  é um fragmento proteolítico que pode ser formado a partir da glicoproteína transmembrana conhecida como APP. A APP pode sofrer diferentes clivagens, sendo que, quando

clivada inicialmente pela enzima  $\alpha$ -secretase, gera fragmentos não tóxicos (via não-amiloidogênica). Porém, quando a APP primeiramente é clivada pela enzima proteolítica  $\beta$ -secretase (via amiloidogênica) identificada como uma protease aspártica conhecida como BACE, pode formar diferentes fragmentos tóxicos, que são os peptídeos  $A\beta$  (Figura 2- adaptada de Van Dam e De Deyn, 2006).



**Figura 2. Geração do peptídeo  $\beta$ - amilóide ( $A\beta$ ).** Processamento da APP por enzimas proteolíticas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  secretases (adaptada de Van Dam e De Deyn, 2006).

Os mecanismos responsáveis pela neurotoxicidade do  $A\beta$  são complexos e parecem estar associados com o desequilíbrio nas concentrações intracelulares dos íons cálcio e potássio, perda da função mitocondrial, redução do metabolismo cerebral da glicose, indução de estresse oxidativo, excitotoxicidade e ativação da morte celular programada (apoptose) (Gomez-Isla e cols., 1997; Zhu e cols., 2001).

Além da hipótese amilóide extensivamente estudada, que identifica o peptídeo  $A\beta$  como uma molécula crítica envolvida na patogênese da DA (Hardy, 2009), existem evidências de que alterações na homeostase do colesterol no sistema nervoso central (SNC) também desempenham um papel importante no desenvolvimento e progressão desta doença (Reiss e cols., 2004; Longenberger e Shah, 2011). Estudos relatam que a agregação do peptídeo  $A\beta$  e o metabolismo do colesterol

no cérebro parecem ser eventos associados, uma vez que, agentes redutores do colesterol, tais como os inibidores da enzima HMG-CoA redutase (responsável pela etapa reguladora da síntese do colesterol), podem reduzir o acúmulo do A $\beta$  por diminuir os níveis de colesterol cerebral (Longenberger e Shah, 2011). De particular importância, um trabalho recente mostrou que a atorvastatina reduziu a morte de células do hipocampo, neuroinflamação e estresse oxidativo induzidos pela administração intracerebroventricular (i.c.v.) de agregados do peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> em camundongos (Piermartiri e cols., 2010). Este estudo sugere que as estatinas não só evitam a agregação do peptídeo A $\beta$  (conforme relatado por Longenberger e Shah, 2011), como também desempenham efeitos protetores, diminuindo a toxicidade induzida pelo peptídeo A $\beta$ .

Outra característica relevante da DA é a ocorrência de disfunção na neurotransmissão colinérgica, incluindo na enzima acetilcolinesterase (AChE) (responsável pela degradação da acetilcolina) (Blennow e cols., 2006). García-Ayllón e colaboradores (2010) mostraram um aumento significativo na atividade da AChE plasmática em pacientes com DA quando comparados a indivíduos do mesmo sexo e da mesma faixa etária.

A neurotoxicidade induzida pelo peptídeo A $\beta$  tem sido relacionada à elevada produção de peróxido de hidrogênio através de mecanismos moleculares ainda pouco conhecidos (Huang e cols., 1999; Jekabsone e cols., 2006). Marcadores de estresse oxidativo são encontrados no micro-ambiente próximo aos depósitos de A $\beta$  na DA (Huang e cols., 1999; Tabner e cols., 2005). Por outro lado, estudos mostram que animais geneticamente modificados que não expressam a GPx-1 (GPx-1<sup>-/-</sup>) tornam-se mais suscetíveis a neurotoxinas (Klivenyi e cols., 2000; De Moura e cols., 2010). Neste contexto, dados *in vitro* mostraram que a superexpressão da GPx aumenta a resistência de neurônios frente à neurotoxicidade induzida pela exposição ao peptídeo beta-amilóide (A $\beta$ ) (Barkats e cols., 2000; Crack e cols., 2006). Esses dados reforçam a hipótese da existência de uma relação importante desta enzima (e seus substratos: peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos) com a fisiopatologia da DA. Um recente estudo demonstrou que a atividade da enzima GPx, que é crucial para a detoxificação de peróxidos no sistema nervoso central (Dringen e cols., 2005), está diminuída no plasma e líquido de pacientes com DA quando comparados com indivíduos normais (Kharrazi e cols., 2008; Torres e cols., 2011; Puertas e cols., 2012).

Além disso, tem sido demonstrado que a ocorrência de processos oxidativos, como peroxidação lipídica e oxidação de

proteínas, contribuem de maneira decisiva para o desenvolvimento dos fenômenos neurodegenerativos da doença (Butterfield e Lauderback, 2002). Modificações oxidativas são observadas no tecido cerebral e fluidos biológicos de pacientes com a DA, como por exemplo a oxidação de ácidos nucleicos, de proteínas e de lipídios. Essas macromoléculas oxidadas também são encontradas em culturas celulares e em modelos animais experimentais da DA (Smith e cols., 2000). Uma das hipóteses é que o processo oxidativo pode ser desencadeado por concentrações elevadas de peróxidos gerados pela presença do peptídeo A $\beta$ . Neste contexto, enzimas antioxidantes, tais com a GPx e compostos capazes de modular positivamente sua atividade podem apresentar relevância terapêutica no que se refere à DA.

### ***1.3.1. Modelos Experimentais da doença de Alzheimer***

Avanços recentes na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos relacionados à DA apontam para novas estratégias no desenvolvimento de fármacos. Os modelos animais têm contribuído consideravelmente para estes avanços, cooperando para a descoberta de moléculas capazes não apenas de aliviar a demência associada com a DA, mas também de modificar a progressão da doença (Van Dam e De Deyn, 2006).

Uma metodologia que vem sendo aplicada para estudar os processos relacionados ao desenvolvimento e progressão da DA consiste na utilização de modelos capazes de induzir o acúmulo do peptídeo A $\beta$  no cérebro de animais. Prejuízos cognitivos têm sido documentados tanto em camundongos geneticamente modificados, que apresentam uma expressão aumentada da APP (Hsiao e cols., 1996; Westerman e cols., 2002), quanto em roedores após a administração central aguda ou crônica dos fragmentos A $\beta$ <sub>1-40</sub> ou A $\beta$ <sub>1-42</sub>, que são análogos aos peptídeos encontrados nas placas senis dos pacientes com a DA.

Até o presente momento, tem sido demonstrado em roedores que a administração intracerebroventricular destes fragmentos é capaz de promover um prejuízo significativo em testes cognitivos, tais como reconhecimento do objeto (Furukawa-Hibi e cols., 2011; Santos e cols., 2012), esQUIVA inibitória (Giovannelli e cols., 1995; Harkany e cols., 1999), labirinto em Y (McDonald e cols., 1996) e labirinto aquático de Morris (Nitta e cols., 1994). Além disso, o modelo animal de administração intracerebroventricular do A $\beta$  apresenta validade preditiva e de analogia, podendo ser utilizado para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para DA (Takeda e cols., 2009).



### ***1.3.2. Tratamento da doença de Alzheimer***

O tratamento da DA inclui estratégias farmacológicas e intervenções psicossociais para o paciente e seus familiares. Inúmeras substâncias psicoativas têm sido propostas para restabelecer ou preservar as funções cognitivas dos pacientes (Mount e Downton, 2006). A reposição da acetilcolina tem mostrado eficácia na melhora da capacidade cognitiva de portadores dessa doença. Os medicamentos usados nesse tipo de terapia são os inibidores da AChE (como a tacrina e a galantamina) e a memantina (antagonista não-competitivo de receptores NMDA). Acredita-se também que essas substâncias possam retardar a evolução natural da doença, possibilitando uma melhora temporária no estado funcional dos pacientes (Blennow e cols., 2006; Mount e Downton, 2006).

Diferentes moléculas estão sendo testadas, com o objetivo de retardar a progressão da DA. Em inúmeros ensaios clínicos e experimentais, compostos antioxidantes estão sendo testados em composição única ou em associação como, por exemplo, as vitaminas E, C e B (Brewer, 2010) e o ácido fólico (Figueiredo e cols., 2011).

De forma geral, os medicamentos utilizados para o tratamento da DA ainda representam uma alternativa meramente paliativa. Os benefícios são sintomáticos e discretos sobre os sintomas clínicos da doença, ou seja, não atuam interferindo diretamente com os mecanismos do processo neurodegenerativo (Grutzendler e Morris, 2001; Institute for Quality and Efficiency in Health Care, 2007).

Tendo em vista a ação terapêutica do probucol e a sua capacidade de aumentar a atividade da enzima glutathione peroxidase *in vitro* e *in vivo*, esse trabalho foi desenvolvido para investigar os possíveis efeitos neuroprotetores desse composto.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito do probucol em modelo experimental *in vivo* da doença de Alzheimer, além de avaliar o possível envolvimento da enzima glutationa peroxidase na neuroproteção.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito protetor do probucol contra a neurotoxicidade induzida pela administração intracerebroventricular do peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) em camundongos (modelo experimental da doença de Alzheimer) através da avaliação de parâmetros comportamentais, bioquímicos e imunoistoquímicos;
- Avaliar, através de estudos *in vitro* com cultura de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), os efeitos do probucol sobre (i) a atividade e expressão da GPx e (ii) a citotoxicidade e produção de espécies reativas de oxigênio induzidas por peróxidos;
- Verificar os efeitos *in vivo* do probucol sobre a atividade e os níveis da GPx em fígado, rim, coração e hipocampo de camundongos;
- Investigar os efeitos do probucol sobre a atividade da GPx-1 purificada de eritrócitos bovinos, através da avaliação de parâmetros cinéticos ( $K_M$  e  $V_{max}$ ).



### 3. RESULTADOS

Essa tese está escrita da seguinte forma: os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios manuscritos e estão divididos em 2 capítulos.

O Capítulo I está na forma de artigo científico, como foi publicado no periódico *Experimental Neurology* (Nos anexos – item 8.1).

O Capítulo II está na forma de manuscrito, como foi submetido para publicação no periódico *Biochemistry*.

Uma breve Discussão geral dos resultados desta tese é apresentada no item 4. As Referências Bibliográficas citadas ao final da dissertação referem-se somente ao texto apresentado na Introdução e Discussão.



## Capítulo I

### **Probucol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid $\beta$ peptide in mice**

Manuscrito completo publicado no periódico  
*Experimental Neurology*

Danúbia Bonfanti Santos, Kaite Cristiane Peres, Renata Pietsch Ribeiro, Dirleise Colle, Alessandra Antunes dos Santos, Eduardo Luiz Moreira, Diogo Onofre Souza, Cláudia Pinto Figueiredo, Marcelo Farina.





## Capítulo II

### **Modulatory effect of probucol on glutathione peroxidase-1 activity**

Manuscrito completo submetido ao periódico  
*Biochemistry*.

Danúbia Bonfanti Santos, Dirleise Colle, Alessandra Antunes dos Santos, Eduardo Luiz Moreira, Mariana Appel Hort, Marcelo Farina.



## **Modulatory effect of probucol on glutathione peroxidase-1 activity**

Danúbia Bonfanti dos Santos<sup>1</sup>; Dirleise Colle<sup>1</sup>; Eduardo Luiz Gasnhar Moreira<sup>1</sup>; Alessandra Antunes dos Santos<sup>1</sup>; Mariana Appel Hort<sup>1</sup>, Jean Pierre Oses<sup>2</sup> and Marcelo Farina<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento, Centro de Ciências da Vida e da Saúde, Universidade Católica de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

**\*Corresponding author:** Marcelo Farina ([farina@ccb.ufsc.br](mailto:farina@ccb.ufsc.br))

Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Campus Universitário, Trindade, Bloco C, Universidade Federal de Santa Catarina, CEP 88040-900, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. Fax: +554837219672; Phone: +55 4837212480.

## Abstract

Glutathione peroxidases (GPxs) represent a class of proteins that catalyzes the reduction of either hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) to water or organic hydroperoxides to their corresponding alcohols at the expenses of reduced glutathione as an essential co-substrate. Probucol is a hypocholesterolemic compound with antioxidant and anti-inflammatory properties that has been reported to increase GPx-1 activity. In this study, we used *in vitro* and *in vivo* approaches to investigate the effect of probucol in modulating GPx-1 activity, as well as potential mechanisms involved in this event. In an *in vitro* protocol with cultured human neuroblastoma cells (SH-SY5Y), probucol (10  $\mu M$ ) significantly increased (around 60%) GPx-1 activity, although no significant effects were observed in GPx-1 protein levels. Moreover, probucol (3 and 10  $\mu M$ ) treatment significantly protected SH-SY5Y cells from organic-hydroperoxide-induced cytotoxicity and ROS production. In a subsequent set of experiments, adult male mice were treated with probucol (~10 mg/Kg/day, during 5 weeks) in order to investigate whether this compound can increase GPx-1 activity under *in vivo* conditions. Probucol-treated animals showed significant increases on GPx-1 activities in liver ( $p < 0.05$ ), kidney ( $p < 0.05$ ), heart ( $p < 0.05$ ), and hippocampus ( $p < 0.01$ ), but did not change GPx-1 levels as evaluated by immunoblotting in these tissues. Finally, enzymatic studies with purified GPx-1 showed that probucol (10 and 30 nM) is able to positively modulate the enzyme activity ( $p < 0.05$ ) by increasing  $V_{max}$  at conditions varying either glutathione ( $p < 0.05$ ) or peroxide (*t*BuOOH;  $p < 0.05$ ) concentrations. Notably,  $K_M$  values were not significantly changed by probucol. Taken together, the results presented herein show, for the first time, that probucol directly increases the  $V_{max}$  of GPx-1. This event is likely related to the higher GPx-1 activity observed in probucol-treated cultured cells (*in vitro*) and mice (*in vivo*). Given that (i) previous experimental studies have shown that probucol protects against pathological conditions mediated by higher peroxide production (or lower detoxification) and that (ii) probucol treatment prevented peroxide-induced cell death in our cell culture model, the increased GPx-1 activity observed after probucol treatment should present physiological and therapeutic relevance. Within this scenario, the present study presents a novel target (GPx-1) and a novel action mechanism (direct activation) for an “old drug”.

Keywords: Glutathione peroxidase, probucol, peroxide, oxidative stress.

**Abbreviations:** CuOOH, cumene hydroperoxide; DCFH-DA, 2P,7P-dichlorodihydrofluorescein diacetate; DMSO, dimethyl sulfoxide; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GSH, glutathione; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, sodium selenite; PB, probucol; ROS, reactive oxygen species; *t*BuOOH, *tert*-butylhydroperoxide.

## 1. Introduction

Reactive oxygen species (ROS) are generated as by-products of cellular metabolism, primarily in the mitochondria (1) and also in other cellular sources (such as NADPH oxidase) (2, 3). Although ROS present physiological effects (4) as signaling molecules necessary for cell growth and survival (5, 6), they have been traditionally regarded as toxic by-products of metabolism with the potential to cause damage to lipids, proteins and DNA, being increasingly implicated in human disease and aging (7).

Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), a well known ROS, is continuously generated during aerobic metabolism from superoxide ( $O_2^{\bullet-}$ ), through a rapid dismutation reaction that can occur either enzymatically with superoxide dismutase (SOD) or spontaneously.  $H_2O_2$  can participate in reactions with reduced transition metals (such as free iron), leading to the generation of the even more reactive hydroxyl radical ( $OH^{\bullet}$ ) (8). Furthermore,  $H_2O_2$  can react directly with sulfhydryl groups of proteins and low-molecular weight antioxidants, which may result in loss of function and damage that, ultimately, compromises the cellular function (9).

Selenium (Se) is an essential micronutrient of major metabolic significance. It is incorporated as selenocysteine at the active site of a wide range of proteins. Under physiological conditions, the Se in selenocysteine is almost fully ionized, hence it is an efficient biological catalyst (10). Thus, Se-containing peroxidases such as the well-know family of glutathione peroxidases (GPxs) represents a powerful class of proteins that catalytically reduces  $H_2O_2$  and organic hydroperoxides to water and the corresponding alcohols using reduced glutathione as an essential co-substrate (11, 12).

In humans, this family of antioxidant proteins represents one of the major components of antioxidant defense system (13) and, to date, five GPx isoenzymes have been identified: the ubiquitous cytosolic (GPx-1), the gastrointestinal-specific (GPx-2), the plasma (GPx-3), the ubiquitous phospholipid hydroperoxide (GPx-4), and the olfactory epithelium- and embryonic tissue-specific (GPx-6) (14).

Of particular importance, GPx-1 (15), the first mammalian selenoprotein to be identified (16, 17) is the most abundant and ubiquitous intracellular isoform (18), and has been found to be more effective than catalase in removing intracellular peroxides under many physiological conditions (19, 20). GPx-1 reduces soluble hydroperoxides, such as hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), and some organic

hydroperoxides, like cumene hydroperoxide (CuOOH) or *tert*-butylhydroperoxide (*t*BuOOH) (21, 22).

Accumulating evidence points to the involvement of GPx-1 in different pathological conditions. Previous studies showed that heterozygous deficiency of GPx-1 leads to endothelial dysfunction and to significant structural vascular and cardiac abnormalities (23). These findings posit that GPx-1 as a key enzyme in protecting vessels against oxidative stress and atherogenesis. Moreover, GPx-1 knockout (GPx-1<sup>-/-</sup>) mice show an increase in vulnerability to oxidative stress and lethality induced by diquat (24). Primary cultures of cortical neurons isolated from GPx-1<sup>-/-</sup> mice are more susceptible to oxidative injury induced by treatment with hydrogen peroxide (25), and hepatocytes from GPx-1<sup>-/-</sup> mice are more sensitive to diquat (26). However, overexpression of glutathione peroxidase confers significant protection against a stroke model possibly through direct scavenging of ROS or through the influencing of signaling mechanisms which lead to tissue damage (27).

Based on the aforementioned evidence, the design and synthesis of low molecular weight catalysts, which mimic natural GPx function, may help elucidate enzyme structure and mechanism as well as serve as pharmaceuticals in the treatment or protection of ROS-related diseases. For example, GPx-mimics such as ebselen and diphenyl diselenide, have been reported to present beneficial effects in different experimental models of diseases (28-30). In this regard, probucol, a hypocholesterolemic agent with antioxidant and anti-inflammatory properties (31), has been reported to enhance endogenous antioxidant systems including GPx, catalase and SOD (32). Interestingly, probucol was able to attenuate oxidative damage in different tissues such as kidney (33), heart (32, 34), liver (35) and brain (36).

Probucol is a phenolic lipid-lowering prototype agent that has a long history of clinical application for the treatment and prevention of cardiovascular diseases (34, 37). This compound present antioxidant and anti-inflammatory effects (31) and has been reported to play protective effects in experimental models of Alzheimer disease (36) and implications of dementia risk (38, 39). Of particular importance, a previous report showed that a two weeks probucol treatment increased the GPx activity in the heart of rats, preventing adriamycin-induced myocardial toxicity (40). A study from our group showed that probucol was able to increase the GPx-1 activity in cultured cerebellar neurons and rendered neurons more resistant to methylmercury, a pollutant whose toxicity involves H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> over production (41). However, the

molecular mechanisms mediating the effects of this compound are not yet fully understood.

Taking into account that (i) GPx-1 is a key enzyme in protecting cells against oxidative stress under both physiological and pathological conditions and that (ii) experimental evidences indicate that probucol increases GPx-1 activity, we took advantage of both *in vitro* and *in vivo* approaches to investigate the effects of probucol in modulating GPx-1 activity, as well as potential mechanisms involved in this event.



## **2. Material and Methods**

### **2.1. CHEMICALS AND ANTIBODIES**

$\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt reduced form, dimethyl sulfoxide, glutathione peroxidase isozyme 1 (GPx-1) from bovine erythrocytes, glutathione reductase from baker's yeast, reduced glutathione, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) and probucol were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Rabbit polyclonal IgG anti-Glutathione Peroxidase (GPx-1/2:), monoclonal anti- $\beta$ -actin primary antibody and protein A/G horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody were purchased from Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA). Dulbecco's modified Eagle's medium F12 (DMEM), fetal bovine serum (FBS) and phosphate-buffered saline (PBS) and were obtained from Gibco Life Technologies (Carlsbad, CA). All other chemicals were of the highest grade available commercially.

### **2.2. CELL CULTURE STUDIES**

The SH-SY5Y human neuroblastoma cells were cultured as monolayer in polystyrene dishes and maintained in DMEM-F12 supplemented with 2 mM glutamine, 100 units/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin and 10% fetal bovine serum (FBS) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Cells were subcultured at confluences (70-80%), used between 10 and 18 passage and the medium was replaced twice a week. The cell suspension was seeded according to the experimental protocol.

#### **2.2.1. Cell viability assays**

Cell viability was measured by two different assays, which evaluate different events of the cellular homeostasis. To these assays, cells were plated into 96 well-plates at equal density ( $1.0 \times 10^4$  cells/well). Cells were pretreated with Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (30 nM), probucol (3 or 10  $\mu$ M) or vehicle (DMSO 0.05%) during 6 days, replacing medium cell culture each 3 days. After the indicated treatments cells were exposed to cumene peroxide (CuOOH, 30 or 100  $\mu$ M) or tert-butyl hydroperoxide (*t*BuOOH, 30 or 100  $\mu$ M), in the new culture medium, for approximately 14 hours (overnight).

The reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT assay), which assesses the activity of labile mitochondrial dehydrogenases, was conducted as described by (42). The lactate dehydrogenase (LDH) release, which evaluates plasma membrane integrity, was measured as previously described (43). Results of MTT assays were expressed as percentage of control values (non treated cells). Results of LDH assays were expressed as percent of LDH released, where the 100% value represents control cells treated with 2% Triton X-100 for 20 min. All experiments were performed in triplicate.

### **2.2.2. Determination of reactive oxygen species (ROS) production**

Intracellular ROS production was measured by incubating the cells in the presence of DCFH-DA. DCFH-DA is a stable, non-fluorescent molecule that readily crosses the cell membrane and is hydrolyzed by intracellular esterases to the non-fluorescent probe DCFH, which is rapidly oxidized in the presence of peroxides to the highly fluorescent 2P,7P-dichlorofluorescein (DCF). To these assays, cells were plated into 24 well-plates at equal density ( $7.5 \times 10^4$  cells/well). Cells were pretreated with probucol (3 or 10  $\mu\text{M}$ ) or vehicle (DMSO 0.05%) during 6 days, replacing medium cell culture each 3 days. After the indicated pretreatments cells were exposed to *t*BuOOH (100  $\mu\text{M}$ ), in the new culture medium, for approximately 14 hours (overnight). At the end of the treatment, cells were loaded with 1  $\mu\text{M}$  DCFH-DA for 20 min at 37°C. After the loading period, cells were washed twice and the fluorescence intensity was measured in a fluorimetric microplate reader (Tecan, Mannedorf, Switzerland) (485 nm excitation and 520 nm emission). Results were expressed as the percentage of control (non-treated cells).

### **2.2.3. GPx activity**

Cells were pretreated with  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (10 or 30 nM), probucol (3 or 10  $\mu\text{M}$ ) or vehicle (DMSO 0.05%) during 6 days, replacing medium cell culture each 3 days. Cultures derived from 6-well plates ( $1.5 \times 10^5$  cells/well) were rinsed and harvested in 150  $\mu\text{L}$  of HEPES buffer (20 mM with 0.05% Triton X-100, pH 7.4). GPx-1 activity was performed based on Handy et al. (2009), by indirectly measuring the consumption of NADPH at 340 nm. The GPx-1 uses GSH to reduce the *t*BuOOH, producing GSSG, which is readily reduced to GSH by GR using

NADPH as a reducing equivalent donor. The results were expressed as percentage of control (non treated cells, 100%).

#### **2.2.4. Western blot**

After the previously described treatments (see GPx-1 activity), cells were rinsed with PBS and collected in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton X-100, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8.0, 40 mM  $\beta$ -glycerolphosphate, 50 mM NaF, 200  $\mu$ M orthovanadate, 5% glycerol and protease inhibitors) and sonicated for 5 minutes. Fifty micrograms of protein extract was subjected to SDS polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) using 15% gels and the proteins were transferred to nitrocellulose membranes using a tank transfer system at 100 V and 400 mA for 90 min. The membranes were blocked (1 h) with 5% skim milk in TBS (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5). Blots were incubated overnight at 4°C with either the primary polyclonal antibody against GPx-1 anti-rabbit (1:250; 22 KDa) or against  $\beta$ -actin (1:2000; 43KDa) in TBS-Tween-BSA buffer (20mM Tris base, 140mM NaCl, 0.05 % Tween-20). After washing, the blots were incubated for 60 min at room temperature with protein A/G-horseradish peroxidase conjugate (1:1000) in TBS-Tween buffer. Then, membranes were washed and developed with Immun-Star HRP Chemiluminescent reagents (Luminol Reagent sc-2048, Santa Cruz, CA, USA) and chemiluminescence was viewed with the ECL System.  $\beta$ -actin was used as loading control. Band intensity was quantified by using the Scion Image software. Densitometric values from GPx-1 bands were normalized with respect to  $\beta$ -actin bands.

### **2.3. *IN VIVO* STUDIES**

#### **2.3.1. Animals**

Adult Swiss male mice (3 month old), from our own breeding colony, were maintained at 22°C, on a 12 h light: 12 h dark cycle, with free access to food and water. All experiments were conducted in accordance with the Guiding Principles in the Use of Animals in Toxicology, adopted by the Society of Toxicology (1989) and were approved by our ethics committee for animal use at the Universidade Federal de Santa Catarina (PP00326/CEUA 23080.013800/2009-90/UFSC).

To investigate the effects of probucol on GPx-1 activity in different tissues, mice were randomly divided into 2 experimental groups (n = 7-8) and were treated daily, for 5 weeks, with probucol (approximately 10 mg/kg/day, drinking water, *ad libitum* (44) or vehicle (1% DMSO, drinking tap water). After the treatment the animals were anesthetized with isoflurane (1 mL/mL; Abbot Laboratórios do Brasil Ltda., RJ, Brazil) using a vaporizer system (SurgiVet Inc., WI, USA) and killed by decapitation.

### **2.3.2. Tissue preparation**

Livers, kidneys, hearts and hippocampi were removed and homogenized (1:10 w/v) in HEPES buffer (20 mM, pH 7.0). The tissue homogenates were centrifuged at 16,000 x g, at 4°C for 20 min and the supernatants obtained were used for the determination of GPx-1 activities, as previously described (see 2.2.3).

For western blot analyses, tissue homogenates were prepared in lysis buffer, as described above. The expression of GPx-1 in different tissues was performed as described in the cell culture (2.2.4.section).

## **2.4. STUDIES WITH PURIFIED GPX-1**

Purified GPx-1 from bovine erythrocytes (Sigma-Aldrich; G6137) was used at 750 mU/mL concentration and prepared in Hank's buffer saline solution (HBSS) for all experiments performed in triplicate.

### **2.4.1. GPx-1 activity measurement**

Purified enzyme GPx-1 was incubated with different concentration of probucol (10-1000 nM) or vehicle (DMSO 0.02% in water) for 30 minutes at 37° C. After the incubation, GPx-1 activity was evaluated as described above (using *t*BuOOH as substrate). Enzyme activity was expressed as percent of control (nmol NADPH oxidized/min).

### 2.4.2. Kinetic studies

Purified enzyme GPx-1 was incubated with probucol (30 nM) or vehicle (DMSO 0.02% in water) and/or mercaptosuccinic acid (MS) (10 - 300  $\mu$ M) for 30 minutes at 37° C. After incubation, GPx-1 activity was evaluated as previously described, using two substrates: GSH and *t*BuOOH. The intercepts of Eadie-Hofstee plots were determined by least squares linear regression. To calculate the values of  $K_M$  and  $V_{max}$  were applied on Eadie-Hofstee plot. The  $K_M$  and  $V_{max}$  for GSH was calculated in concentration gradient 0.5 -10 mM in the reactive solution, in the presence of *t*BuOOH (1 mM). It was also calculated for *t*BuOOH in concentration gradient 0.3 - 3 mM in the presence of GSH (2 mM). Enzyme activity was expressed as percent of control. The maximum velocities ( $V_{max}$ ), Michaelis constants ( $K_M$ ) and  $IC_{50}$  (Inhibitory concentration of MS inducing 50% of inhibition of GPx-1 activity) values were calculated using the GraphPad Prism 5 Software (San Diego, CA).

### 2.5. Protein determination

Protein content was estimated by the methods of (45), using bovine serum albumin as a standard.

### 2.6. Statistical analyses

Statistical analysis of the data was performed using the STATISTICA software system, version 8.0. (StatSoft, Inc., 2008). Significant differences were evaluated by Student's t-test, one-way or two-way analysis of variance (ANOVA). Following significant ANOVAs, multiple post-hoc comparisons were performed using the Tukey *post hoc* test. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. The differences were considered significant when  $p < 0.05$ . All graphics were made using the GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

### 3. Results

#### Effects of probucol in neuroblastoma cells

Firstly, we performed an *in vitro* study in order to evaluate the effects of probucol toward the activity of GPx-1 in cultured neuroblastoma cells (SH-SY5Y). Specifically, probucol (10  $\mu\text{M}$ ) was able to increase the GPx-1 activity (Figure 1) and this stimulatory effect was similar to those obtained in cells treated with  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (10 and 30 nM), a positive control. Interestingly, probucol (3 and 10  $\mu\text{M}$ ) treatment protected SH-SY5Y cells from CuOOH (30  $\mu\text{M}$ ) induced toxicity as showed in the MTT and LDH assays (Figure 2A and B), suggesting that the increased GPx-1 activity observed in probucol-treated cells might be responsible for such phenomenon. Similar results were obtained when *t*BuOOH was used as challenge (data not shown). Accordingly, probucol (3 and 10  $\mu\text{M}$ ) was also able to blunt the increase in reactive oxygen species (ROS) in SH-SY5Y cells exposed to *t*BuOOH 100  $\mu\text{M}$  (Figure 3), corroborating data from Figures 1 and 2.

Afterwards, we investigated whether the increased GPx-1 activity was related to an increase in GPx-1 protein levels. To this end, we assessed GPx-1 expression by Western blot analyses. No significant changes were observed in the protein levels when cells were treated with probucol. Conversely, a significant increase in GPx-1 expression was observed in the cells treated with  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (positive control) (Figure 4).

#### *In vivo* effects of probucol

Thereafter, we performed an additional study to investigate whether probucol would increase GPx-1 activity under *in vivo* conditions. Adult male mice were treated with probucol (approximately 10 mg/Kg/day) or vehicle during 5 weeks. Liquid consumption was not different between probucol and control animals, which received just vehicle (data not shown). After treatments, GPx-1 activity was measured in liver, kidney, hearth and hippocampus (Figure 5). Probuco treatment caused a significant increase on GPx-1 activities in all tissues analyzed. Once again, western blot analyses showed that the levels of the enzyme were not changed after probucol treatment (Figure 6).

### ***In vitro* tests with GPx-1 purified**

Based on the aforementioned results, one could posit to a potential direct effect of probucol toward the GPx-1 activity. Thus, we performed an *in vitro* study with the purified enzyme in an attempt to investigate whether probucol is an activator of GPx-1. GPx-1 activity was significantly increased after incubation with 10 and 30 nM probucol (Figure 7). However, probucol inhibited GPx-1 activity when present at concentrations greater than 10  $\mu$ M (data not shown).

Next, the effects of probucol on GPx-1 activity were investigated in the presence of a classical enzyme's inhibitor, mercaptosuccinic acid. The results showed that the  $IC_{50}$  value of mercaptosuccinic acid was not modified in the presence of probucol [37.65 (27.96-50.70)  $\mu$ M] compared with the control condition [42.98 (25.46-72.56)  $\mu$ M] ( $p=0.86$ ; Figure 8).

In order to better comprehend how probucol directly increases GPx-1 activity, the Eadie-Hofstee equation was used (46). We found a significant ( $p < 0.05$ ) increase in the maximum velocity ( $V_{max}$ ) of GPx-1 for GSH concentration gradient, although no significant effects of probucol were observed in the Michaelis constant ( $K_M$ ) in presence of a fixed *t*BuOOH concentration (1mM). A significant ( $p < 0.05$ ) increase in the maximum velocity ( $V_{max}$ ) of GPx-1 was also observed for *t*BuOOH concentration gradient, but no significant effects of probucol were observed in the  $K_M$  in presence of a fixed GSH concentration (2 mM) (Table 1).

## Discussion

The clinical benefits of probucol in humans have been reported to be closely related to its cholesterol-lowering properties (47). However, this compound may also lead to pleiotropic effects owing to its anti-inflammatory and antioxidant properties, thus exerting beneficial effects in preventing atherosclerosis beyond its effects on the lipid profile (48). Moreover, previous studies from our research group have demonstrated that probucol is able to protect neuronal cells from neurotoxic insults (36, 41, 49) due to events that are related, at least in part, to its antioxidant property and the modulation of GPx-1 activity.

In this context, our study investigated the effects of probucol on GPx-1 activity at different experimental conditions (*in vitro* and *in vivo*) in an attempt to elucidate mechanisms mediating its previously reported stimulatory effects toward such enzyme (40). The major finding from our study shows the ability of probucol in positively modulating the activity of GPx-1 in *in vitro* as well as *in vivo* experimental conditions. On the other hand, western blot analysis showed that probucol exposures did not change GPx-1 levels in SH-SY5Y cells and animal tissues, excluding the effects of this compound at protein levels.

GPx-1 is a crucial enzyme involved in the neuronal detoxification of peroxides (50, 51). GPx-1-deficient mice have increased susceptibility to neurotoxins (24, 52) and cell injury after insults that increase *in vivo* oxidative stress (53). In cultured neurons isolated from GPx-1 knockout (GPx-1<sup>-/-</sup>) mice, enhanced susceptibility to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis correlates with increased accumulation of intracellular ROS (54). Nevertheless, GPx-1-overexpression is protective against neuronal damage induced by neurotoxins or pathological conditions (55, 56). Notably, we observed that probucol significantly decreased the cytotoxicity induced by peroxides (CuOOH and *t*BuOOH) in cultured neuroblastoma cells, suggesting that its stimulatory effects toward GPx-1 activity present physiological relevance in protecting cells against the oxidative damage induced by peroxides. This idea is reinforced by the fact that probucol also decreased the levels of ROS in SH-SY5Y cells exposed to *t*BuOOH. These results are relevant taking into consideration that GPx mimetics have been developed as potential therapeutic strategies to treat overt inflammation associated with the pathophysiology of many human disorders, including Alzheimer's disease and stroke (28). However, to the best of our knowledge, data on molecules that positively modulates the activity of *endogenous* peroxidases are scarce. The direct



stimulatory effect of a drug toward the endogenous GPx-1 activity represents a novel concept that opens new therapeutic perspectives and points to GPx-1 as a potential molecular target involved in the beneficial effects of probucol. Notable, we detected a significant stimulatory effect on GPx-1 activity in different tissues (liver, heart, kidney and hippocampus; Figure 5) of probucol-treated mice, suggesting the occurrence of an ubiquitous event that is not exclusively related to neuronal cells.

In an attempt to better understand molecular events mediating the direct activation of GPx-1 by probucol, *in vitro* studies with substrate (GSH or *t*BuOOH) concentration gradients were performed. The pre-incubation of GPx-1 with probucol increased the enzyme's  $V_{\max}$ , although no significant changes on substrate binding ( $K_M$ ) values were detected (Figure 9). These results indicate that the higher GPx-1 activity observed after probucol treatment is not related to a higher affinity of the enzyme by GSH and/or *t*BuOOH, but likely involves higher catalytic effects. Our results are in line with the idea that the actual catalytic effect and the binding affinity are independent of each other (57). This hypothesis is in agreement with data on the inhibitory effects of MS. In fact, MS inhibits GPx-1 by competing with GSH for binding to the active-site selenocysteine (58). Since probucol did not change the  $IC_{50}$  value of MS (Figure 8), it is reasonable to suppose that it does not affect the affinity of selenium from selenocysteine by GSH, which is in accordance with the absence of significant effects of probucol on  $K_M$  values (Table 1).

In summary, the results presented herein show, for the first time, that probucol directly increases the  $V_{\max}$  of GPx-1. This event is likely related to the higher GPx-1 activity observed in probucol-treated cultured cells (*in vitro*) and mice (*in vivo*). Given that (i) previous experimental studies have shown that probucol protects against pathological conditions mediated by higher peroxide production (36, 41, 49) and that (ii) probucol treatment prevented peroxide-induced cell death in our cell culture model, the increased GPx-1 activity observed after probucol treatment should present physiological and therapeutic relevance. In this context, the present study presents a novel target (GPx-1) and a novel action mechanism (direct activation) for an "old drug", rendering probucol an interesting and promising compound for further pharmacological studies.

## Legends

**Figure 1. Effect of probucol on GPx activity in cultured human neuroblastoma cells.** Cells were pretreated for 6 days with probucol (PB, 3 or 10  $\mu\text{M}$ ) sodium selenite ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , positive control, 10 or 30 nM) or vehicle. Cellular GPx activity was measured and expressed as percentage of control (non treated cells, dashed line, 100%). Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  indicates the difference when compared with the control group (One-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test). Basal enzyme activity was  $2.38 \pm 0.23$  nmol NADPH oxidized/min/mg proteins.

**Figure 2. Effect of probucol on the peroxide-induced cytotoxicity in human neuroblastoma cells.** Cells were pretreated for 6 days with probucol (PB, 3 and 10  $\mu\text{M}$ ), sodium selenite ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , 30 nM) or vehicle and then were exposed to cumene peroxide ( $\text{CuOOH}$ , 30 or 100  $\mu\text{M}$ ) for approximately 14 hours. Cell viability was assessed by MTT reduction (A) and expressed as percentage of control (non treated cells, 100%). LDH release (B) was expressed as percentage of positive control (triton treated cell, 100%). Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments.\*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  indicates the difference when compared with the control group (absence of peroxide). #  $p < 0.05$  indicates the difference when compared with the  $\text{CuOOH}$  group alone (Two-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test).

**Figure 3. Effect of probucol on *t*BuOOH-induced reactive oxygen species (ROS) production in cultured human neuroblastoma cells.** Cells were pretreated for 6 days with probucol (PB, 3 or 10  $\mu\text{M}$ ) or vehicle and then were exposed to *tert*-butyl hydroperoxide (*t*BuOOH, 100  $\mu\text{M}$ ) for 14 hours. ROS were measured by the fluorescence emitted by DCF-DA and expressed as percentage of control (non treated cells, 100%, dashed line). Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments \*\*\*  $p < 0.001$  indicates the difference when compared with the control group; #  $p < 0.05$ ; ###  $p < 0.001$  indicates the difference when compared with *t*BuOOH group (Two-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test).

**Figure 4. Effect of probucol on GPx expression in cultured human neuroblastoma cells.** Cells were pretreated for 6 days with probucol (PB,

3 or 10  $\mu\text{M}$ ), sodium selenite ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , positive control, 10 or 30 nM) or vehicle. Cellular GPx protein levels was measured by western blot and expressed as percentage of control (non treated cells, 100%). Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 3-4 independent experiments. \*  $p < 0.05$  indicates the difference when compared with the control group (One-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test).

**Figure 5. Effect of probucol on GPx activity in liver (A), kidney (B), heart (C) and hippocampus (D) from mice.** Mice were treated for 5 weeks with probucol (PB) 10 mg/kg/day (drinking water) or vehicle (control, 1% DMSO). GPx activity was measured and expressed as percentage of control ( $n = 7-8$  animals per group). Basal GPx activity (nmol NADPH oxidized /min/mg protein) was  $80.62 \pm 1.04$  in the liver,  $58.58 \pm 2.75$  in the kidney,  $36.69 \pm 2.67$  in the heart and  $6.43 \pm 0.28$  in the hippocampus (mean  $\pm$  SEM). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  indicates the difference when compared with the control group (Student's *t* test).

**Figure 6. Effect of probucol on GPx-1 expression in liver (A), kidney (B), heart (C) and hippocampus (D) from mice.** Mice were treated for 5 weeks with probucol (PB) 10 mg/kg/day (drinking water) or vehicle (control, 1% DMSO). GPx-1 levels are standardized by actin levels (GPx/actin ratio) and expressed as optical density. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 3 - 4 animals.

**Figure 7. Effect of probucol on purified GPx-1 activity.** The enzyme GPx-1 from bovine erythrocytes (750 mU/mL) was incubated with different concentrations of probucol (10-1000 nM) in Hank's solution (HBSS). GPx activity was measured and expressed as percentage of control (100%, without probucol). Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 4 experiments. \* $p < 0.05$  indicates the difference when compared with the control group (One-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test). Enzyme activity was expressed as percent of control.

**Figure 8. Effect of probucol on GPx-1 purified activity in the presence of inhibitor.** The enzyme GPx-1 from bovine erythrocytes (750 mU/mL) was incubated with 30 nM of probucol in Hank's solution (HBSS) at 37°C. After 30 minutes of incubation, the enzyme activity was determined in the presence of different concentrations of mercaptosuccinic acid (MS 10 - 300  $\mu\text{M}$ ) inhibitor. Each point represents the mean  $\pm$  SEM of 4 experiments. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  indicates the difference when

compared with the control group (One-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test).

**Table 1. Kinetic parameters: maximum velocities ( $V_{\max}$ ), Michaelis constants ( $K_M$ ) calculated by GSH and *t*BuOOH concentration gradients.** Results were expressed in mean  $\pm$  SEM of 3-4 independent experiments.  $V_{\max}$  and  $K_M$  were calculated in GraphPad Prism version 5.00 for Windows using of Eadie-Hofstee plots. \*  $p < 0.05$  indicates the difference when compared with the control group (paired *t* test).

### Acknowledgments

The financial supports by (i) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and INCT-CNPq-Excitotoxicity and Neuroprotection are gratefully acknowledged.

## References

1. Staniek, K., and Nohl, H. (1999) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection from intact mitochondria as a measure for one-electron reduction of dioxygen requires a non-invasive assay system, *Biochim Biophys Acta* 1413, 70-80.
2. Anilkumar, N., Weber, R., Zhang, M., Brewer, A., and Shah, A. M. (2008) Nox4 and nox2 NADPH oxidases mediate distinct cellular redox signaling responses to agonist stimulation, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1347-1354.
3. Dikalov, S. I., Dikalova, A. E., Bikineyeva, A. T., Schmidt, H. H., Harrison, D. G., and Griendling, K. K. (2008) Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production, *Free Radic Biol Med* 45, 1340-1351.
4. McClung, J. P., Roneker, C. A., Mu, W., Lisk, D. J., Langlais, P., Liu, F., and Lei, X. G. (2004) Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8852-8857.
5. Goldstein, B. J., Mahadev, K., Wu, X., Zhu, L., and Motoshima, H. (2005) Role of insulin-induced reactive oxygen species in the insulin signaling pathway, *Antioxid Redox Signal* 7, 1021-1031.
6. Stone, J. R., and Yang, S. (2006) Hydrogen peroxide: a signaling messenger, *Antioxid Redox Signal* 8, 243-270.
7. Li, J. M., and Shah, A. M. (2004) Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287, R1014-1030.
8. Perron, N. R., and Brumaghim, J. L. (2009) A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding, *Cell Biochem Biophys* 53, 75-100.
9. Winterbourn, C. C., and Hampton, M. B. (2008) Thiol chemistry and specificity in redox signaling, *Free Radic Biol Med* 45, 549-561.
10. Lobanov, A. V., Hatfield, D. L., and Gladyshev, V. N. (2009) Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes, *Biochim Biophys Acta* 1790, 1424-1428.

11. Raes, M., Michiels, C., and Remacle, J. (1987) Comparative study of the enzymatic defense systems against oxygen-derived free radicals: the key role of glutathione peroxidase, *Free Radic Biol Med* 3, 3-7.
12. Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohe, R., Aumann, K. D., Roveri, A., Schomburg, D., and Flohe, L. (1995) Diversity of glutathione peroxidases, *Methods Enzymol* 252, 38-53.
13. Lu, J., and Holmgren, A. (2009) Selenoproteins, *J Biol Chem* 284, 723-727.
14. Kryukov, G. V., Castellano, S., Novoselov, S. V., Lobanov, A. V., Zehtab, O., Guigo, R., and Gladyshev, V. N. (2003) Characterization of mammalian selenoproteomes, *Science* 300, 1439-1443.
15. Mills, G. C. (1957) Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown, *J Biol Chem* 229, 189-197.
16. Flohé, L., Gunzler, W. A., and Schock, H. H. (1973) Glutathione peroxidase: a selenoenzyme, *FEBS Lett* 32, 132-134.
17. Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G., and Hoekstra, W. G. (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase, *Science* 179, 588-590.
18. Arthur, J. R. (2000) The glutathione peroxidases, *Cell Mol Life Sci* 57, 1825-1835.
19. Antunes, F., Han, D., and Cadenas, E. (2002) Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in in vivo conditions, *Free Radic Biol Med* 33, 1260-1267.
20. Cohen, G., and Hochstein, P. (1963) Glutathione Peroxidase: The Primary Agent for the Elimination of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes, *Biochemistry* 2, 1420-1428.
21. Forstrom, J. W., Stults, F. H., and Tappel, A. L. (1979) Rat liver cytosolic glutathione peroxidase: reactivity with linoleic acid hydroperoxide and cumene hydroperoxide, *Arch Biochem Biophys* 193, 51-55.
22. Flohé, L., and Schlegel, W. (1971) [Glutathione peroxidase. IV. Intracellular distribution of the glutathione peroxidase system in the rat liver], *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 352, 1401-1410.

23. Forgiione, M. A., Cap, A., Liao, R., Moldovan, N. I., Eberhardt, R. T., Lim, C. C., Jones, J., Goldschmidt-Clermont, P. J., and Loscalzo, J. (2002) Heterozygous cellular glutathione peroxidase deficiency in the mouse: abnormalities in vascular and cardiac function and structure, *Circulation* 106, 1154-1158.
24. Fu, Y., Cheng, W. H., Ross, D. A., and Lei, X. (1999) Cellular glutathione peroxidase protects mice against lethal oxidative stress induced by various doses of diquat, *Proc Soc Exp Biol Med* 222, 164-169.
25. de Haan, J. B., Bladier, C., Griffiths, P., Kelner, M., O'Shea, R. D., Cheung, N. S., Bronson, R. T., Silvestro, M. J., Wild, S., Zheng, S. S., Beart, P. M., Hertzog, P. J., and Kola, I. (1998) Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide, *J Biol Chem* 273, 22528-22536.
26. Fu, Y., Sies, H., and Lei, X. G. (2001) Opposite roles of selenium-dependent glutathione peroxidase-1 in superoxide generator diquat- and peroxynitrite-induced apoptosis and signaling, *J Biol Chem* 276, 43004-43009.
27. Weisbrot-Lefkowitz, M., Reuhl, K., Perry, B., Chan, P. H., Inouye, M., and Mirochnitchenko, O. (1998) Overexpression of human glutathione peroxidase protects transgenic mice against focal cerebral ischemia/reperfusion damage, *Brain Res Mol Brain Res* 53, 333-338.
28. Day, B. J. (2009) Catalase and glutathione peroxidase mimics, *Biochem Pharmacol* 77, 285-296.
29. Huang, X., Dong, Z., Liu, J., Mao, S., Xu, J., Luo, G., and Shen, J. (2007) Selenium-mediated micellar catalyst: an efficient enzyme model for glutathione peroxidase-like catalysis, *Langmuir* 23, 1518-1522.
30. Hort, M. A., Straliozzo, M. R., Netto, P. M., da Rocha, J. B., de Bem, A. F., and Ribeiro-do-Valle, R. M. (2011) Diphenyl diselenide effectively reduces atherosclerotic lesions in LDLr <sup>-/-</sup> mice by attenuation of oxidative stress and inflammation, *J Cardiovasc Pharmacol* 58, 91-101.
31. Nakamura, R., Egashira, K., Machida, Y., Hayashidani, S., Takeya, M., Utsumi, H., Tsutsui, H., and Takeshita, A. (2002) Probucol attenuates left ventricular dysfunction and remodeling in tachycardia-

- induced heart failure: roles of oxidative stress and inflammation, *Circulation* 106, 362-367.
32. Asiri, Y. A. (2010) Probucol attenuates cyclophosphamide-induced oxidative apoptosis, p53 and Bax signal expression in rat cardiac tissues, *Oxid Med Cell Longev* 3, 308-316.
  33. Yoshida, M., Kimura, H., Kyuki, K., and Ito, M. (2006) Combined effect of probucol and insulin on renal damage in diabetic rats fed a high cholesterol diet, *Eur J Pharmacol* 548, 174-180.
  34. Yamashita, S., and Matsuzawa, Y. (2009) Where are we with probucol: a new life for an old drug?, *Atherosclerosis* 207, 16-23.
  35. Zhan, Y. T., Weng, J., Li, L., Xu, Q., Song, X., and Guo, X. X. (2011) Protective effect of probucol on liver injury induced by carbon tetrachloride in rats, *Hepatol Int*.
  36. Santos, D. B., Peres, K. C., Ribeiro, R. P., Colle, D., dos Santos, A. A., Moreira, E. L., Souza, D. O., Figueiredo, C. P., and Farina, M. (2012) Probucol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid beta peptide in mice, *Exp Neurol* 233, 767-775.
  37. Buckley, M. M., Goa, K. L., Price, A. H., and Brogden, R. N. (1989) Probucol. A reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use in hypercholesterolaemia, *Drugs* 37, 761-800.
  38. Champagne, D., Pearson, D., Dea, D., Rochford, J., and Poirier, J. (2003) The cholesterol-lowering drug probucol increases apolipoprotein E production in the hippocampus of aged rats: implications for Alzheimer's disease, *Neuroscience* 121, 99-110.
  39. Pallebage-Gamarallage, M. M., Takechi, R., Lam, V., Galloway, S., Dhaliwal, S., and Mamo, J. C. (2010) Post-prandial lipid metabolism, lipid-modulating agents and cerebrovascular integrity: implications for dementia risk, *Atheroscler Suppl* 11, 49-54.
  40. Li, T., and Singal, P. K. (2000) Adriamycin-induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol, *Circulation* 102, 2105-2110.
  41. Farina, M., Campos, F., Vendrell, I., Berenguer, J., Barzi, M., Pons, S., and Sunol, C. (2009) Probucol increases glutathione peroxidase-1 activity and displays long-lasting protection against methylmercury toxicity in cerebellar granule cells, *Toxicol Sci* 112, 416-426.



42. Vendrell, I., Carrascal, M., Vilaro, M. T., Abian, J., Rodriguez-Farre, E., and Sunol, C. (2007) Cell viability and proteomic analysis in cultured neurons exposed to methylmercury, *Hum Exp Toxicol* 26, 263-272.
43. Petegnief, V., Friguls, B., Sanfeliu, C., Sunol, C., and Planas, A. M. (2003) Transforming growth factor-alpha attenuates N-methyl-D-aspartic acid toxicity in cortical cultures by preventing protein synthesis inhibition through an Erk1/2-dependent mechanism, *J Biol Chem* 278, 29552-29559.
44. Siveski-Iliskovic, N., Hill, M., Chow, D. A., and Singal, P. K. (1995) Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect, *Circulation* 91, 10-15.
45. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem* 193, 265-275.
46. Montgomery, R., and C. Swenson (1976) *Quantitative Problems in the Biochemical Science.*, 2nd edition ed., San Francisco.
47. Zimetbaum, P., Eder, H., and Frishman, W. (1990) Probucol: pharmacology and clinical application, *J Clin Pharmacol* 30, 3-9.
48. Kasai, T., Miyauchi, K., Kubota, N., Kajimoto, K., Amano, A., and Daida, H. (2011) Probucol therapy improves long-term (>10-year) survival after complete revascularization: a propensity analysis, *Atherosclerosis* 220, 463-469.
49. Colle, D., Hartwig, J. M., Soares, F. A., and Farina, M. (2012) Probucol modulates oxidative stress and excitotoxicity in Huntington's disease models in vitro, *Brain Res Bull* 87, 397-405.
50. Liddell, J. R., Hoepken, H. H., Crack, P. J., Robinson, S. R., and Dringen, R. (2006) Glutathione peroxidase 1 and glutathione are required to protect mouse astrocytes from iron-mediated hydrogen peroxide toxicity, *J Neurosci Res* 84, 578-586.
51. Dringen, R., Pawlowski, P. G., and Hirrlinger, J. (2005) Peroxide detoxification by brain cells, *J Neurosci Res* 79, 157-165.
52. Klivenyi, P., Andreassen, O. A., Ferrante, R. J., Dedeoglu, A., Mueller, G., Lancelot, E., Bogdanov, M., Andersen, J. K., Jiang, D., and Beal, M. F. (2000) Mice deficient in cellular glutathione peroxidase show increased vulnerability to malonate, 3-nitropropionic

- acid, and 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine, *J Neurosci* 20, 1-7.
53. Van Remmen, H., Qi, W., Sabia, M., Freeman, G., Estlack, L., Yang, H., Mao Guo, Z., Huang, T. T., Strong, R., Lee, S., Epstein, C. J., and Richardson, A. (2004) Multiple deficiencies in antioxidant enzymes in mice result in a compound increase in sensitivity to oxidative stress, *Free Radic Biol Med* 36, 1625-1634.
54. Taylor, J. M., Ali, U., Iannello, R. C., Hertzog, P., and Crack, P. J. (2005) Diminished Akt phosphorylation in neurons lacking glutathione peroxidase-1 (Gpx1) leads to increased susceptibility to oxidative stress-induced cell death, *J Neurochem* 92, 283-293.
55. Bensadoun, J. C., Mirochnitchenko, O., Inouye, M., Aebischer, P., and Zurn, A. D. (1998) Attenuation of 6-OHDA-induced neurotoxicity in glutathione peroxidase transgenic mice, *Eur J Neurosci* 10, 3231-3236.
56. Ridet, J. L., Bensadoun, J. C., Deglon, N., Aebischer, P., and Zurn, A. D. (2006) Lentivirus-mediated expression of glutathione peroxidase: neuroprotection in murine models of Parkinson's disease, *Neurobiol Dis* 21, 29-34.
57. Koshland, D. E. (1958) Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 44, 98-104.
58. Chaudiere, J., Wilhelmssen, E. C., and Tappel, A. L. (1984) Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acids and other mercaptans, *J Biol Chem* 259, 1043-1050.

Figure 1

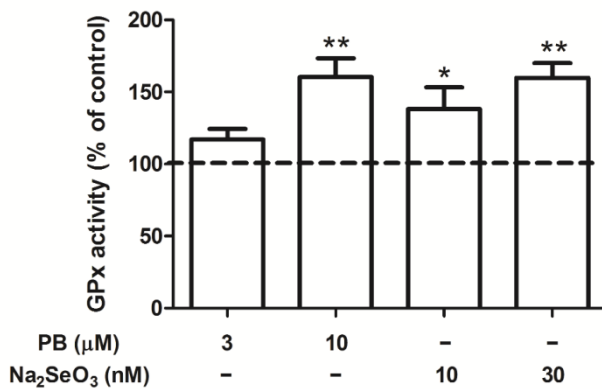


Figure 2

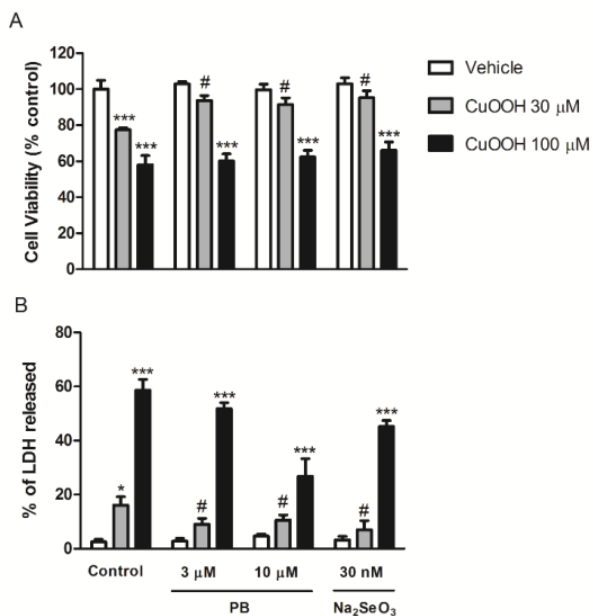


Figure 3

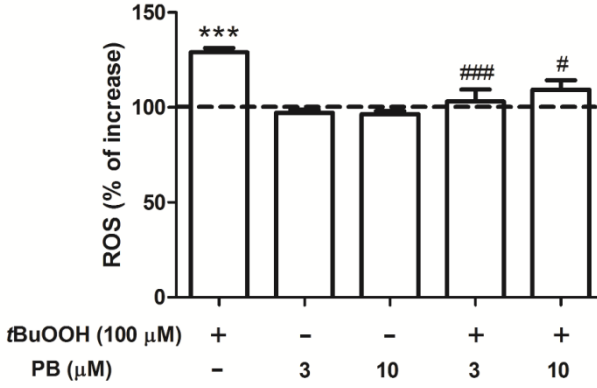


Figure 4

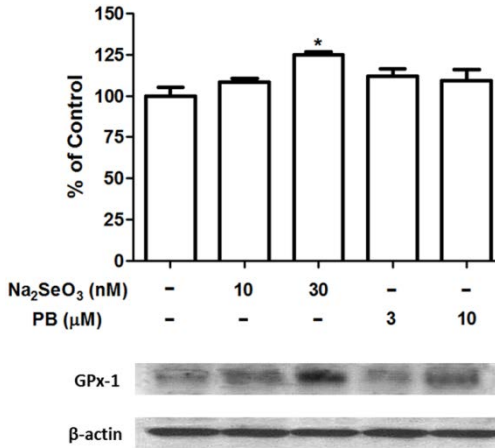


Figure 5

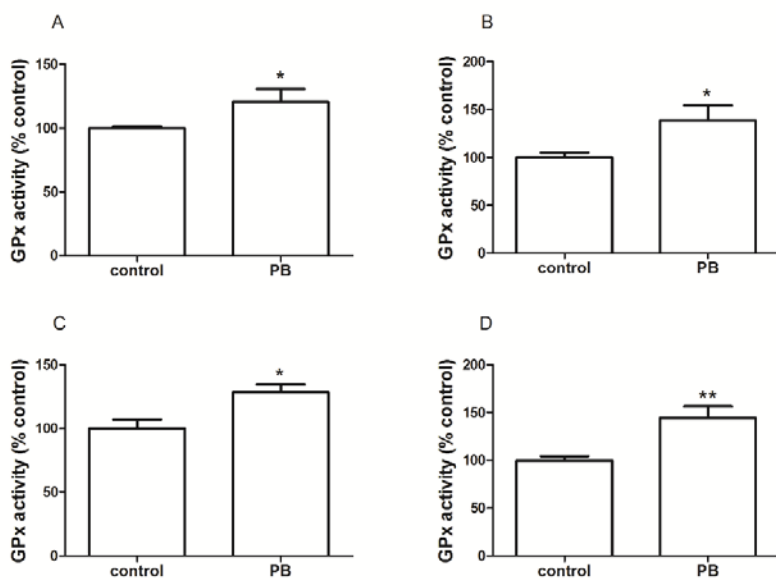


Figure 6

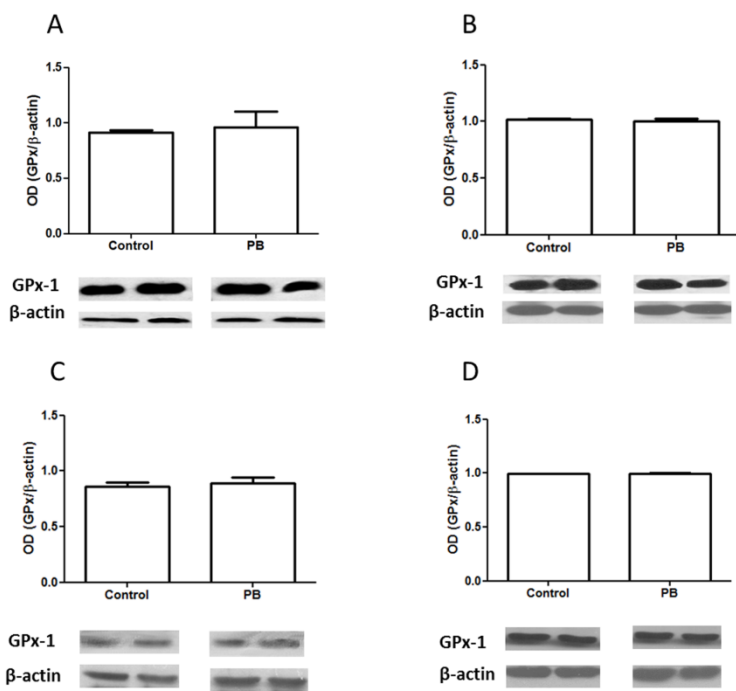


Figure 7

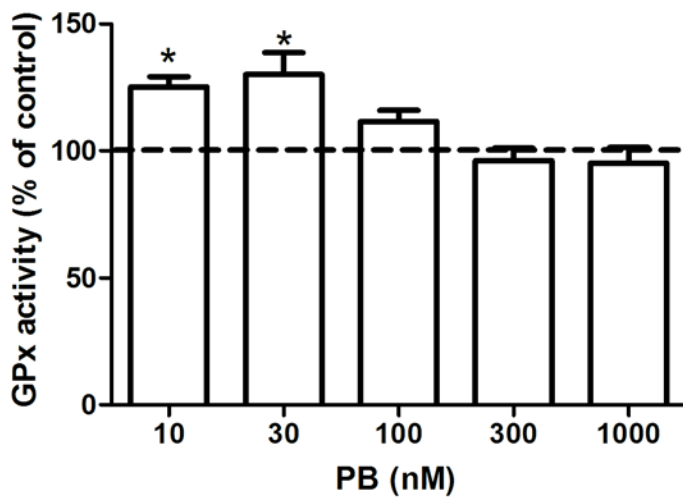
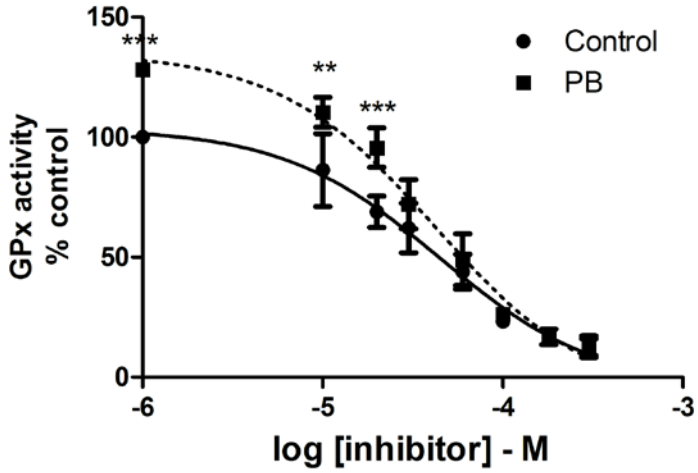


Figure 8





**Table 1**

Substrate	GSH		tBuOOH	
	$V_{max}$	$K_M$ (mM)	$V_{max}$	$K_M$ (mM)
<b>Control</b>	0.0474±0.0053	0.0028±0.004	0.1837±0.0145	0.0551±0.0047
<b>PB</b>	0.0527±0.0054*	0.0029±0.007	0.1966±0.0102*	0.0581±0.0033



## 4. DISCUSSÃO

Desde a sua descrição inicial em 1906, a DA vem sendo caracterizada como uma patologia neurodegenerativa progressiva com sintomas atribuídos principalmente ao acúmulo de placas senis e emaranhados neurofibrilares (Goedert e Spillantini, 2006). Além disso, o acúmulo destes marcadores é normalmente acompanhado pela perda de neurônios, principalmente em áreas corticais e formação hipocampal, resultando na perda progressiva das funções cognitivas (Selkoe, 2000). Diversos fatores parecem estar envolvidos na patogênese da DA como o estresse oxidativo e processos inflamatórios (Medeiros e cols., 2007; Sinha e cols., 2012).

O entendimento dos mecanismos moleculares relacionados com a patogênese da DA tem crescido bastante nos últimos anos, graças ao desenvolvimento de modelos animais que mimetizam características fenotípicas ou genotípicas da doença. Dentre os modelos utilizados para estudar DA, está a administração intracerebroventricular do  $A\beta_{1-40}$  (Takeda e col., 2009).

As propriedades neurotóxicas do peptídeo  $A\beta$  de principalmente 40 e 42 aminoácidos permitiu aos pesquisadores usar um modelo *in vivo* que mimetiza os efeitos do desenvolvimento da DA, provendo uma alternativa aos modelos baseados em animais transgênicos (McDonald e Overmeyer, 1998).

Neste contexto, a primeira parte do nosso estudo teve como objetivo investigar os efeitos do probucol, sobre parâmetros de estresse oxidativo, bem como sobre parâmetros comportamentais em modelo experimental de DA induzido pelo  $A\beta_{1-40}$  em hipocampo de camundongos. Nosso protocolo experimental, baseado na administração do  $A\beta_{1-40}$  i.c.v. (400 p mol/sítio), induziu uma perda significativa na memória dos animais. Esse efeito já vem sendo mostrado em trabalhos anteriores que utilizaram o modelo do  $A\beta_{1-40}$  i.c.v. utilizando outros testes comportamentais (Medeiros e cols., 2007; Prediger e cols., 2007). O tratamento com probucol (10 mg/kg/dia intraperitoneal) durante 2 semanas foi capaz de minimizar o dano cognitivo causado pelo  $A\beta_{1-40}$ .

A perda da memória e o déficit no aprendizado são características evidenciadas em pacientes com DA (Mattsson, 2004) e podem estar diretamente relacionados à formação das placas senis (Cummings e cols., 1996). Além disso, a perda de sinapses em estruturas cerebrais de pacientes com DA pode ser correlacionada à gravidade desses sintomas cognitivos (Scheff e cols., 2006). Nesse

estudo, a administração do  $A\beta_{1-40}$  induziu alteração significativa na homeostase sináptica nos animais, observada pela diminuição dos níveis de sinaptofisina no hipocampo. Estudos prévios sugerem uma ligação entre os eventos de perda sináptica e dano cognitivo (Shen e cols., 2012). Essa idéia é reforçada pelo fato que o tratamento com probucol foi capaz de prevenir a perda sináptica induzida pelo  $A\beta_{1-40}$  em camundongos.

O tratamento com  $A\beta_{1-40}$  também induziu um aumento nos níveis hipocampais das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e o tratamento com probucol foi capaz de atenuar essa lipoperoxidação. Esse resultado sugere que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na toxicidade mediada pelo  $A\beta_{1-40}$ . Esse efeito é bem evidenciado na literatura, onde estudos relatam os efeitos pró-oxidantes do  $A\beta_{1-40}$  (Piermartiri e cols., 2010; Tabner e cols., 2006), bem como os efeitos antioxidantes do probucol (Farina e cols., 2009; Park e cols., 2007). O tratamento com o probucol aumentou a atividade da glutathione redutase (GR) no hipocampo dos animais, o que poderia contribuir para seus efeitos protetores observados contra a neurotoxicidade induzida pelo  $A\beta_{1-40}$ .

Embora seja provável que as propriedades antioxidantes do probucol contribuam para seus efeitos benéficos contra o dano sináptico e cognitivo induzido pelo  $A\beta_{1-40}$ , estes podem também estar relacionados às propriedades anti-inflamatórias ou modulatórias sobre o metabolismo do colesterol. A atividade antiinflamatória do probucol parece ser importante para seu efeito protetor sobre o sistema cardiovascular (Poirier, 2003; Tanous e col., 2006; Yamashita e Matsuzawa, 2009). Porém, com base em evidências prévias (Farina e cols., 2009; Colle e cols., 2012), parece razoável supor que esse efeito também pode ser importante em modelos envolvendo o sistema nervoso central. Ademais, recentes estudos corroboram com a idéia de que modificações na homeostase do colesterol é um fator importante na DA (Leduc e cols., 2010), sendo que pode estar associada ao processo amiloidogênico (Guardia-Laguarta e cols., 2009). Além disso, dados da literatura vêm demonstrando que fármacos que possuem ação hipolipemiante podem reduzir a formação do  $A\beta$  e serem utilizados como um possível tratamento para a DA (Refolo e cols., 2001; Eehalt e cols., 2003; Xiong e cols., 2008). Piermartiri e colaboradores (2010) mostraram que a atorvastatina (inibidor da HMG-COA redutase) pode prevenir danos induzidos pelo  $A\beta_{1-40}$  no hipocampo. Da mesma forma, o probucol também protegeu dos efeitos tóxicos do  $A\beta_{1-40}$ , sugerindo que ambos agentes hipolipemiantes podem agir, ao menos em parte, de

forma similar sobre a toxicidade desse peptídeo. No entanto, outros mecanismos de ação também podem estar envolvidos nos efeitos protetores, já que o probucol possui propriedades antioxidantes diretas, o que não é evidenciado para as estatinas.

A relação entre o sistema colinérgico e a patogênese e sintomas da DA vem sendo relatada (Van Beek e Claassen, 2011). A perda de inervação colinérgica tem sido documentada durante os estágios avançados da DA (Schliebs e Arendt, 2011). Por outro lado, inibidores da acetilcolinesterase (AChE) proporcionaram efeitos benéficos aos pacientes da DA em fases iniciais da doença (Holzgrave e cols., 2007). Nossos resultados mostraram que o tratamento com  $A\beta_{1-40}$  induziu um aumento na atividade da enzima AChE e o probucol foi capaz de atenuar o efeito estimulatório do  $A\beta_{1-40}$  na enzima. Evidências experimentais têm mostrado um aumento na atividade da AChE no sistema nervoso central (SNC) durante eventos de estresse oxidativo (Khadrawy e cols., 2011). No nosso estudo, foi observada uma correlação positiva entre a peroxidação lipídica e a atividade da AChE no hipocampo, reforçando a relação positiva entre o estresse oxidativo e a atividade da AChE (efeitos foram abolidos para os animais que foram tratados com probucol).

Em conjunto, estes dados derivados do protocolo *in vivo* (administração icv de  $A\beta_{1-40}$ ) sugerem que o probucol é capaz de prevenir os prejuízos cognitivos e sinápticos, bem como atenuar o estresse oxidativo e a estimulação da AChE, induzidos pela administração i.c.v. do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ .

Dados recentes do nosso grupo de pesquisa vêm demonstrando que o probucol protege células neuronais de insultos tóxicos (Farina e cols., 2009; Colle e cols., 2012). Este efeito pode estar relacionado às suas propriedades antioxidantes e, mais especificamente, à atividade modulatória do composto sobre a enzima GPx. No modelo experimental da DA utilizado em nosso estudo, observamos o papel neuroprotetor do probucol, entretanto a atividade da GPx não foi modificada pelo tratamento realizado durante duas semanas pela via intraperitoneal (i.p.). Apesar disso, os efeitos modulatórios do probucol sobre a GPx-1 podem fazer desta enzima um alvo farmacológico importante, visto que estudos vêm demonstrando uma importante correlação entre a GPx e a DA (Tabner e cols., 2005; Torres e cols., 2011; Puertas e cols., 2012). Neste sentido, o segundo trabalho foi realizado na tentativa de compreender os mecanismos do probucol sobre a atividade e expressão da GPx, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*.

Nossos resultados mostraram que o probucol apresenta a capacidade de modular positivamente a enzima GPx-1, tanto em experimentos *in vitro* como em condições *in vivo*. Além disso, medidas de níveis de proteínas para GPx-1 foram realizadas em células SH-SY5Y e em diferentes tecidos de animais e nenhuma alteração foi observada.

A GPx-1 é uma enzima crucial para detoxificação de peróxidos (Dringen e cols., 2005, Liddell e cols., 2006). Camundongos *Knockout* (GPx-1<sup>-/-</sup>) mostraram um aumento na suscetibilidade a toxinas (Fu e cols., 1999; Klivenyi e cols., 2000) e ao estresse oxidativo (Van Remmen e cols., 2004). Da mesma forma, em cultura de neurônios isolados de camundongos GPx-1<sup>-/-</sup>, houve um aumento na sensibilidade das células quando tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Taylor e cols., 2005). No entanto, estudos demonstraram que a super-expressão da enzima protege contra danos induzidos por toxinas e condições patológicas (Bensadoun e cols., 1998, Ridet e cols., 2006).

Além disso, compostos miméticos da GPx têm sido desenvolvidos e estudados como estratégias terapêuticas para diferentes patologias (Day, 2009, Hort et al., 2011, Huang et al., 2007). Nossos resultados mostram que o probucol diminui significativamente a citotoxicidade causada por peróxidos (CuOOH e *t*BuOOH) em células de neuroblastoma, sugerindo que seus efeitos estimulatórios da atividade GPx-1 apresentam relevância fisiológica na proteção contra peróxidos. Essa idéia é reforçada pelo fato que o composto é capaz de evitar o acúmulo de produtos finais de espécies reativas de oxigênio (ERO) em células expostas ao *t*BuOOH.

Em camundongos, os efeitos modulatórios do probucol na enzima GPx foram observados em diferentes tecidos (fígado, rim, coração e cérebro), mostrando que esse efeito não se restringe somente a células neuronais. Nesse estudo, os camundongos foram tratados durante 5 semanas (via oral) com probucol na dose de aproximadamente 10 mg/kg. A mesma dose foi utilizada no estudo anterior, porém os animais foram tratados por um curto período de tempo (2 semanas). Acredita-se através desses dados, que o efeito modulatório do probucol pode ocorrer principalmente a longo prazo, pelo aumento da concentração intracelular do composto, mas não por eventos relacionados à síntese protéica. Os resultados corroboram com estudos realizados em nosso laboratório que mostraram que o probucol pode aumentar a atividade da GPx em modelos experimentais das doenças de Parkinson e de Huntington (dados não publicados).

Como tentativa de melhor compreender os eventos que medeiam a ativação direta da GPx pelo probucol, estudos *in vitro* com diferentes gradientes de substratos (GSH e *t*BuOOH) foram realizados. A pré-incubação da GPx com o probucol aumentou a velocidade máxima ( $V_{\max}$ ), embora nenhuma mudança significativa foi observada sobre a afinidade de ligação ao substrato ( $K_M$ ). Esses resultados indicam que o aumento na atividade da GPx observado na presença do probucol não está relacionado a uma maior afinidade da enzima pelos substratos GSH e *t*BuOOH. Nossos resultados corroboram com a idéia de que o efeito catalítico e afinidade de ligação são fatores independentes (Koshland, 1958).

Por outro lado, compostos capazes de mimetizar a ação da GPx estão sendo desenvolvidos como possíveis estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças, incluindo a DA (Day, 2009). Porém, existem poucos relatos de moléculas capazes de modular a atividade da GPx. O efeito estimulador direto sobre a atividade da enzima GPx-1 endógena representa um novo conceito que pode abrir novas perspectivas terapêuticas. Isso pode tornar o probucol uma molécula alvo para futuros estudos com patologias envolvidas principalmente com o estresse oxidativo.

Em resumo, os resultados referentes ao segundo trabalho mostram, pela primeira vez, que o probucol aumenta diretamente os valores de  $V_{\max}$  da GPx-1. Esse evento provavelmente está relacionado ao aumento da atividade da GPx-1 observado nas células e nos animais tratados com probucol. Além disso, o probucol preveniu as células da morte celular induzida por peróxido, onde a atividade da GPx também foi aumentada. Nesse contexto, o presente estudo apresenta um novo alvo (GPx-1) e o mecanismo de ação (ativação direta) para um “antigo medicamento”, tornando o probucol um composto interessante e promissor para estudos farmacológicos.





## 5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta tese de doutorado, podemos inferir que:

### Capítulo I

- O tratamento com probucol foi capaz de minimizar os prejuízos cognitivos induzidos pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) em camundongos;
- A peroxidação lipídica e a perda sináptica hipocampal induzidas pelo  $A\beta$  foram minimizadas pelo tratamento dos camundongos com probucol;
- O composto preveniu as alterações induzidas pelo  $A\beta$  na atividade da acetilcolinesterase no hipocampo.

### Capítulo II

- O probucol modulou positivamente a atividade da enzima glutationa peroxidase, mas não alterou os níveis dessa enzima em cultura de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y);
- A citotoxicidade e a produção de espécies reativas de oxigênio induzidas por peróxidos foi atenuada pelo tratamento de células de neuroblastoma com probucol;
- O probucol aumentou a atividade da GPx em fígado, rim, coração e hipocampo de camundongos, mas não alterou os níveis protéicos dessa enzima;
- O composto testado foi capaz de modular positivamente a atividade da GPx-1 purificada, aumentando os valores de  $V_{max}$ .

Sendo assim, esses resultados indicam que o probucol é um composto capaz de reduzir os prejuízos cognitivos e bioquímicos induzidos pela toxicidade do  $A\beta$  em hipocampo de camundongos, provavelmente devido à suas propriedades antioxidantes (embora a possível modulação da homeostase do colesterol não possa ser descartada como evento importante relacionado à proteção observada). Além disso, foram evidenciadas propriedades antioxidantes e protetoras do probucol frente ao dano oxidativo induzido por peróxidos em modelos experimentais *in vitro*, as quais parecem relacionar-se, ao menos em parte, à modulação positiva da atividade da enzima GPx-1, também observada nos experimentos *in vitro* como *in vivo*.



## 6. PERSPECTIVAS

Alguns aspectos relacionados a este trabalho ainda precisam ser melhor elucidados. Desta forma, algumas perspectivas são propostas ao final desta tese:

- Investigação dos efeitos do probucol e succinobucol (derivado do probucol que não apresenta efeitos adversos no sistema cardíaco) sobre a morte celular induzida pelo  $A\beta_{1-40}$  agregado em cultivo primário de neurônios corticais;
- Investigação do mecanismo de proteção do probucol e do succinobucol em cultivo primário de neurônios corticais de camundongos expostos ao  $A\beta_{1-40}$  agregado;
- Realização de estudos toxicológicos com o probucol, para melhor avaliar as doses de segurança deste fármaco e seus efeitos colaterais.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES F, HAN D, CADENAS E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification *in vivo* conditions. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33: 1260–1267.

BARKATS M, MILLECAMPS S, ABRIOUX P, GEOFFROY MC, MALLET J. Overexpression of glutathione peroxidase increases the resistance of neuronal cells to Abeta-mediated neurotoxicity. *J Neurochem.* 2000; 75: 1438–1446.

BARNHART JW, SEFRANKA JA, MCINTOSH DD. Hypocholesterolemic effect of 4, 4 (isopropylidenedithio)-bis (2,6-di-t-butylphenol) (probucoI). *Am J Clin Nutr.* 1970; 23: 1229–33.

BENSADOUN JC, MIROCHNITCHENKO O, INOUYE M, AEBISCHER P, ZURN AD. Attenuation of 6-OHDA-induced neurotoxicity in glutathione peroxidase transgenic mice. *Eur J Neurosci.* 1998; 10: 3231-3236.

BLENNOW K, DE LEON MJ, ZETTERBERG H. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2006; 368: 387-403.

BRAAK H, BRAAK E. Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl.* 1998; 53: 127–140.

BREWER GJ. Why vitamin E therapy fails for treatment of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2010; 19: 27-30.

BUTTERFIELD DA, LAUDERBACK CM. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32: 1050-1060.

CHAMPAGNE D, PEARSON D, DEA D, ROCHFORD J, POIRIER J. The cholesterol-lowering drug probucoI increases apolipoprotein E production in the hippocampus of aged rats: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 2003; 121: 99-110.

COHEN G, HOCHSTEIN P. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry.* 1963; 2: 1420–1428.

COLLE D, HARTWIG JM, SOARES FA, FARINA M. ProbucoI modulates oxidative stress and excitotoxicity in Huntington's disease models *in vitro*. *Brain Res Bull.* 2012; 87: 397-405.

COTMAN CW, BERCHTOLD NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 2002; 25: 295–301.

CRACK PJ, CIMDINS K, ALI U, HERTZOG PJ, IANNELLO RC. Lack of glutathione peroxidase-1 exacerbates A $\beta$ -mediated neurotoxicity in cortical neurons. *J Neural Transm.* 2006; 113: 645–657.

CUMMINGS BJ, PIKE CJ, SHANKLE R, COTMAN CW. Beta-amyloid deposition and other measures of neuropathology predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1996; 17: 921–933.

DAY BJ. Catalase and glutathione peroxidase mimics. *Biochem Pharmacol.* 2009; 77: 285–296.

DE MOURA MB, DOS SANTOS LS, VAN HOUTEN B. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and cancer. *Environ Mol Mutagen.* 2010; 51: 391–405.

DICKSON DW. Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: a perspective from longitudinal clinicopathological studies. *Neurobiol Aging.* 1997; 18: 21–26.

DRINGEN R, PAWLOWSKI PG, HIRRLINGER J. Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res.* 2005; 79: 157–165.

EHEHALT R, KELLER P, HAASS C, THIELE C, SIMONS K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* 2003; 160: 113–123.

ESWORTHY RS, HO YS, CHU FF. The Gpx1 gene encodes mitochondrial glutathione peroxidase in the mouse liver. *Arch Biochem Biophys.* 1997; 340: 59–63.

FARINA M, CAMPOS F, VENDRELL I, BERENQUER J, BARZI M, PONS S, SUNOL C. Probucol increases glutathione peroxidase-1 activity and displays long-lasting protection against methylmercury toxicity in cerebellar granule cells. *Toxicol Sci.* 2009; 112: 416–426.

FARINA M, FRIZZO ME, SOARES FA, SCHWALM FD, DIETRICH MO, ZENI G, ROCHA JB, SOUZA DO. Ebselen protects against methylmercury-induced inhibition of glutamate uptake by cortical slices from adult mice. *Toxicol Lett.* 2003; 144: 351–357.

FIGUEIREDO CP, BICCA MA, LATINI A, PREDIGER RDS, MEDEIROS R, CALIXTO JB. Folic Acid Plus  $\alpha$ -Tocopherol Mitigates Amyloid- $\beta$ -Induced

Neurotoxicity through Modulation of Mitochondrial Complex Activity. *J Alzheimer's Dis.* 2011; 24: 61–75.

FLOHÉ L, EISELE B, WENDEL A. Glutathion peroxidase. I. Isolation and determinations of molecular weight. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1971; 352: 151–158.

FLOHÉ L, GUNZLER WA, SCHOCK HH. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* 1973; 32: 132–134.

FRANCO JL, BRAGA HC, STRINGARI J, MISSAU FC, POSSER T, MENDES BG, LEAL RB, SANTOS AR, DAFRE AL, PIZZOLATTI MG, FARINA M. Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quercetin. *Chem Res Toxicol.* 2007; 20: 1919-1926.

FU Y, CHENG WH, ROSS DA, LEI X. Cellular glutathione peroxidase protects mice against lethal oxidative stress induced by various doses of diquat. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999; 222: 164-169.

FURUKAWA-HIBI Y, ALKAM T, NITTA A, MATSUYAMA A, MIZOGUCHI H, SUZUKI K, MOUSSAOUI S, YU QS, GREIG NH, NAGAI T, YAMADA K. Butyrylcholinesterase inhibitors ameliorate cognitive dysfunction induced by amyloid- $\beta$  peptide in mice. *Behav Brain Res.* 2011; 225: 222-229.

GARCÍA-AYLLÓN MS, RIBA-LLENA I, SERRA-BASANTE C, ALOM J, BOOPATHY R, BOOPATHY R, SÁEZ-VALERO J. Altered Levels of Acetylcholinesterase in Alzheimer Plasma. *PLoS ONE.* 2010; 5: 8701-8712.

GARDANEH M, GHOLAMI M, MAGHSOUDI N. Synergy Between Glutathione Peroxidase-1 and Astrocytic Growth Factors Suppresses Free Radical Generation and Protects Dopaminergic Neurons against 6-Hydroxydopamine. *Rejuvenation Res.* 2011; 14: 195-204.

GEARING M, MIRRA SS, HEDREEN JC, SUMI SM, HANSEN LA, HEYMAN A. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part X. Neuropathology confirmation of the clinical diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurology.* 1995; 45: 461-466.

GIOVANNELLI L, CASAMENTI F, SCALI C, BARTOLININ L, PEPEU G. Differential effects of amyloid peptides  $\beta$ -(1-40) and  $\beta$ -(25-35) injections into the rat nucleus basalis. *Neuroscience.* 1995; 66: 781-792.

GLENNER GG, WONG CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 120: 885–890.

GOEDERT M, SPILLANTINI MG. A century of Alzheimer's disease. *Science.* 2006; 314: 777-781.

GOMEZ-ISLA T, HOLLISTER R, WEST H, MUI S, GROWDON JH, PETERSEN RC, PARISIJE, HYMAN BT. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1997; 41: 17-24.

GORELICK PB. Risk factors for vascular dementia and Alzheimer disease. *Stroke.* 2004; 35: 2620-2622.

GRUTZENDLER J, MORRIS JC. Cholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. *Drugs.* 2001; 61: 41-52.

GUARDIA-LAGUARTA C, COMA M, PERA M, CLARIMON J, SERENO L, AGULLO JM, MOLINA-PORCEL L, GALLARDO E, DENG A, BEREZOVSKA O, HYMAN BT, BLESIA R, GOMEZ-ISLA T, LLEO A. Mild cholesterol depletion reduces amyloid-beta production by impairing APP trafficking to the cell surface. *J. Neurochem.* 2009; 110: 220-230.

HARDY J. The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *J Neurochem.* 2009; 110: 1129-1134.

HARDY JA, HIGGINS GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 1992; 256:184–185.

HARKANY T, MULER J, SASVAN M, ABRAHAM I, KONYA C, ZARANDI M, PENKE B, LUITEN PGM, NYAKAS C. N-Methyl-d-aspartate receptor antagonist MK- 801 and radical scavengers protect cholinergic nucleus basalis neurons against  $\beta$ -amyloid neurotoxicity. *Neurobiol Dis.* 1999; 6: 109-121.

HOLZGRABE U, KAPKOVA P, ALPTUZUN V, SCHEIBER J, KUGELMANN E. Targeting acetylcholinesterase to treat neurodegeneration. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2007; 11: 161-179.

HORT MA, STRALIOTTO MR, NETTO PM, DA ROCHA JB, DE BEM AF, RIBEIRO-DO-VALLE RM. Diphenyl diselenide effectively reduces atherosclerotic lesions in LDLr  $-/-$  mice by attenuation of oxidative stress and inflammation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011; 58: 91-101.



HSIAO K, CHAPMAN P, NILSEN S, ECKMAN C, HARIGAYA Y, YOUNKIN S, YANG F, COLE G. Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*. 1996; 274: 99-102.

HUANG X, CUAJUNCO MP, ATWOOD CS, HARTSHORN MA, TYNDALL JD, HANSON GR, STOKES KC, LEOPOLD M, MULTHAUP G, GOLDSTEIN LE, SCARPA RC, SAUNDERS AJ, LIM J, MOIR RD, GLABE C, BOWDEN EF, MASTERS CL, FAIRLIE DP, TANZI RE, BUSH AI. Cu(II) potentiation of alzheimer abeta neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction. *J Biol Chem*. 1999; 274: 37111-37116.

INSTITUTE FOR QUALITY AND EFFICIENCY IN HEALTH CARE: EXECUTIVE SUMMARIES. Cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. 2007; A05-19.

JEKABSONE A, MANDER PK, TICKLER A, SHARPE M, BROWN GC. Fibrillar beta-amyloid peptide A $\beta_{1-40}$  activates microglial proliferation via stimulating TNF-alpha release and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derived from NADPH oxidase: a cell culture study. *J Neuroinflammation*. 2006; 3: 24.

KAMINNYI AI, LANKIN VZ, PEREPELITSA EI, KONOVALOVA GG, SAMKO AN, TIKHAZE AK, KUKHARCHUK VV, BELENKOV YN. Relationship between free-radical lipid oxidation and efficiency of coronary angioplasty in coronary patients. *Bull Exp Biol Med*. 2007; 144: 664-666.

KHADRAWY YA, NOUR NA, ABOUL EZZ HS. Effect of oxidative stress induced by paradoxical sleep deprivation on the activities of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and acetylcholinesterase in the cortex and hippocampus of rat. *Transl. Res*. 2011; 157: 100-107.

KHARRAZI H, VAISI-RAYGANI A, RAHIMI Z, TAVILANI H, AMINIAN M, POURMOTABBED T. Association between enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense mechanism with apolipoprotein E genotypes in Alzheimer disease. *Clin Biochem*. 2008; 41: 932-936.

KLIVENYI P, ANDREASSEN OA, FERRANTE RJ, DEDEOGLU A, MUELLER G, LANCELOT E, BOGDANOV M, ANDERSEN JK, JIANG D, BEAL MF. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase show increased vulnerability to malonate, 3-nitropropionic acid, and 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *J Neurosci*. 2000; 20: 1-7.

KOSHLAND DE. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1958; 44: 98-104.

KRAUS RJ, FOSTER SJ, GANTHER HE. Identification of selenocysteine in glutathione peroxidase by mass spectroscopy. *Biochemistry*. 1983; 22: 5853–5858.

KRYUKOV GV, CASTELLANO S, NOVOSELOV SV, LOBANOV A V, ZEHTAB O, GUIGO R, GLADYSHEV VN. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*. 2003; 300, 1439–1443.

KUNSCH C, LUCHOUMUN J, GREY JY, OLLIFF LK, SAINT LB, ARRENDALE RF, WASSERMAN MA, SAXENA U, MEDFORD RM. Selective Inhibition of Endothelial and Monocyte Redox-Sensitive Genes by AGI-1067: A Novel Antioxidant and Anti-Inflammatory Agent. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004; 308: 820–829.

LEDUC V, JASMIN-BELANGER S, POIRIER J. APOE and cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Mol. Med*. 2010; 16: 469-477.

LEVY-LAHAD E, WASCO W, POORKAJ P, ROMANO DM, OSHIMA J, PETTINGELL WH, YU CE, JONDRO PD, SCHMIDT SD, WANG K, CROWLEY AC, FU Y, GUENETTE SY, GALAS D, NEMENS E., WIJSMAN EM, BIRD TD, SCHELLENBERG GD, TANZI RE. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 1995; 269: 973–977.

LIDDELL JR, HOEPKEN HH, CRACK PJ, ROBINSON SR, DRINGEN R. Glutathione peroxidase 1 and glutathione are required to protect mouse astrocytes from iron-mediated hydrogen peroxide toxicity. *J Neurosci Res*. 2006; 84: 578-586.

LIU GX, OU DM, LIU JH, HUANG HL, LIAO DF. Probucol inhibits lipid peroxidation of macrophage and affects its secretory properties. *Acta Pharmacol Sin*. 2000; 21: 637-640.

LONGENBERGER J, SHAH ZA. Simvastatin and Other HMG-CoA Reductase Inhibitors on Brain Cholesterol Levels in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res*. 2011; 8: 434-442.

LUBOS E, LOSCALZO J, HANDY D. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15: 1957-1997.

LUCHSINGER JA, MAYEUX R. Cardiovascular risk factors and Alzheimer's disease. *Curr Atherosclerosis Rep*. 2004; 6: 261-266.

MATTSON MP. Gene-diet interactions in brain aging and neurodegenerative disorders. *Ann Intern Med.* 2003; 139: 441–444.

MATTSON MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 2004; 430: 631-639.

McDONALD MP, DAHL EE, OVERMIER YB, BANDYOPADHYAY S, BABCOCK D, CLEARY J. Reversal of b-amyloid-induced retention deficit after exposure to training and state cues. *Neurobiol Learn Mem.* 1996; 65: 35-47.

MCDONALD MP, OVERMIER JB. Present imperfect: a critical review of animal models of the mnemonic impairments in Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev.* 1998; 22: 99-120.

MEDEIROS R, PREDIGER RD, PASSOS GF, PANDOLFO P, DUARTE FS, FRANCO JL, DAFRE AL, DI GIUNTA G, FIGUEIREDO CP, TAKAHASHI RN, CAMPOS MM, CALIXTO JB. 2007. Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein. *J. Neurosci.* 2007; 27: 5394-5404.

MENG CQ, SOMERS PK, HOONG LK, ZHENG XS, YE Z, WORSENCROFT KJ, SIMPSON JE, HOTE MA MR, WEINGARTEN MD, MAC DML, HILL RR, MARINO EM, SUEN KL, LUCHOONUN J, KUNSCH C, LANDERS LK, STEFANOPOULOS D, HOWARD RB, SUNDELL CL, SAXENA U, WASSERMAN MA, SIKORSKI JA. Discovery of novel phenolic antioxidants as inhibitors of vascular cell adhesion molecule-1 expression for use in chronic inflammatory diseases. *J Med Chem.* 2004; 47: 6420–6432.

MICHIHARA A, SAWAMURA M, YAMORI Y, AKASAKI K, TSUJI H. Probucol Decreases Mevalonate Pyrophosphate Decarboxylase in the Rat Liver. *Biol Pharm Bull.* 2003; 26: 1484-1486.

MILLS GC. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem.* 1957; 229: 189–197.

MIWA T, ADACHI T, ITO Y, HIRANO K, SUGIURA M. Purification and properties of glutathione peroxidase from human liver. *Chem Pharm Bull.* 1983; 31: 179–185.

MOLLER HJ, GRAEBER MB. The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and

neurohistological sections. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 1998; 248: 111–122.

MOUNT C, DOWNTON C. Alzheimer disease: progress or profit? *Nat Med.* 2006; 12: 780-784.

NAGY Z, ESIRI MM, JOBST KA, MORRIS JH, KING EM, MCDONALD B, LITCHFIELDS, SMITH A, BARNETSON L, SMITH AD. Relative roles of plaques and tangles in the dementia of Alzheimer's disease: correlations using three sets of neuropathological criteria. *Dementia.* 1995; 6: 21-31.

NITTA A, ITOH A, HASEGAWA T, NABESHIMA T.  $\beta$ -Amyloid protein induced Alzheimer's disease animal model. *Neurosci Lett* 1994;170: 63-66.

PARK SY, LEE JH, KIM CD, RHIM BY, HONG KW, LEE WS. Beneficial synergistic effects of concurrent treatment with cilostazol and probucol against focal cerebral ischemic injury in rats. *Brain Res.* 2007; 1157: 112-120.

PFUETZE KD, DUJOVNE CA. Probuco. *Curr Atheroscler Rep.* 2000; 2: 47-57.

PIERMARTIRI TC, FIGUEIREDO CP, RIAL D, DUARTE FS, BEZERRA SC, MANCINI G, DE BEM AF, PREDIGER RD, TASCA CI. Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid-beta(1-40) administration in mice: evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. *Exp Neurol.* 2010; 226: 274-284.

POIRIER J. Apolipoprotein E and cholesterol metabolism in the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. *Trends Mol Med.* 2003; 9: 94-101.

POIRIER J. Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2005; 26: 355-361.

POWER JHT, PETER BLUMBERGS PC. Cellular glutathione peroxidase in human brain: cellular distribution, and its potential role in the degradation of Lewy bodies in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol.* 2009; 117: 63-73.

PREDIGER RD, FRANCO JL, PANDOLFO P, MEDEIROS R, DUARTE FS, DI GIUNTA G, FIGUEIREDO CP, FARINA M, CALIXTO JB, TAKAHASHI RN, DAFRE AL. Differential susceptibility following beta-amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. *Behav. Brain Res.* 2007; 177: 205-213.

PUERTAS MC, MARTÍNEZ-MARTOS JM, COBO MP, CARRERA MP, MAYAS MD, RAMÍREZ-EXPÓSITO MJ. Plasma oxidative stress parameters in men and women with early stage Alzheimer type dementia. *Exp Gerontol*. 2012; 47: 625-630.

REFOLO LM, PAPPOLLA MA, LAFRANCOIS J, MALESTER B, SCHMIDT SD, THOMAS-BRYANT T, TINT GS, WANG R, MERCKEN M, PETANCESKA SS, DUFF KE. A cholesterol lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis*. 2001; 8: 890-899.

REGNSTROM J, WALLDIUS G, NILSSON S, ELINDER LS, JOHANSSON J, MOLGAARD J, HOLME I, OLSSON AG, NILSSON J. The effect of probucol on low density lipoprotein oxidation and femoral atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1996; 125: 217-229.

REISS AB, SILLER KA, RAHMAN MM, CHAN ES, GHISO J, DE LEON MJ. Cholesterol in neurologic disorders of the elderly: stroke and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2004; 25: 977-989.

RIDET JL, BENSADOUN JC, DEGLON N, AEBISCHER P, ZURN AD. Lentivirus-mediated expression of glutathione peroxidase: neuroprotection in murine models of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2006; 21: 29-34.

RITCHIE K, LOVESTONE S. The dementias. *Lancet*. 2002; 360: 1759-1766.

ROTRUCK JT, POPE AL, GANTHER HE, SWANSON AB, HAFEMAN DG, HOEKSTRA WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. 1973; 179: 588-590.

SANTOS DB, PERES KC, RIBEIRO RP, COLLE D, DOS SANTOS AA, MOREIRA EL, SOUZA DO, FIGUEIREDO CP, FARINA M. Probuco, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid beta peptide in mice. *Exp Neurol*. 2012; 233: 767-775.

SCHEFF SW, PRICE DA, SCHMITT FA, MUFSON EJ. Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol. Aging*. 2006; 27: 1372-1384.

SCHLIEBS R, ARENDT T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav. Brain Res*. 2011; 221: 555-563.

SELKOE DJ. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 924: 17-25.

SHEN JN, WANG DS, WANG R. The protection of acetylcholinesterase inhibitor on  $\beta$ -amyloid-induced the injury of neurite outgrowth via regulating axon guidance related genes expression in neuronal cells. *Int J Clin Exp Pathol.* 2012; 5: 900-913.

SHERRINGTON R, ROGAEV EI, LIANG Y, ROGAEVA EA, LEVESQUE G, IKEDA M, CHI H, LIN C, LI G, HOLMAN K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HA, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature.* 1995; 375: 754-760.

SINGH AK, DHAUNSI GS, GUPTA MP, ORAK JK, ASAYAMA K, SINGH I. Demonstration of glutathione peroxidase in rat liver peroxisomes and its intraorganellar distribution. *Arch Biochem Biophys.* 1994; 315: 331-338.

SINGLA DK, KAUR K, SHARMA AK, DHINGRA S, SINGAL PK. Probucol promotes endogenous antioxidant reserve and confers protection against reperfusion injury. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007; 85: 439-443.

SINHA M, BHOWMICK P, BANERJEE A, CHAKRABARTI S. Antioxidant role of amyloid  $\beta$  protein in cell-free and biological systems: implication for the pathogenesis of Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med.* 2012; 5849: 01170-01177.

SMITH MA, ROTTKAMP CA, NUNOMURA A, RAINA AK, PERRY G. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1502: 139-144.

SUNDELL CL, SOMERS PK, MENG CQ. AGI-1067: a multifunctional phenolic antioxidant, lipid modulator, anti-inflammatory and antiatherosclerotic agent. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 305: 1116-1123.

TABNER BJ, EL-AGNAF OM, TURNBULL S, GERMAN MJ, PALEOLOGOU KE, HAYASHI Y, COOPER LJ, FULLWOOD NJ, ALLSOP D. Hydrogen peroxide is generated during the very early stages of aggregation of the amyloid peptides implicated in Alzheimer disease and familial British dementia. *J Biol Chem.* 2005; 280: 35789-35792.

TABNER BJ, TURNBULL S, KING JE, BENSON FE, EL-AGNAF OM, ALLSOP D. A spectroscopic study of some of the peptidyl radicals formed following hydroxyl radical attack on beta-amyloid and alpha-synuclein. *Free Radic. Res.* 2006; 40: 731-739.

TAKEDA S, SATO N, NIISATO K, TAKEUCHI D, KURINAMI H, SHINOHARA M, RAKUGI H, KANO M, MORISHITA R. Validation of A $\beta$ 1-40 administration into mouse cerebroventricles as an animal model for Alzheimer disease. *Brain Res.* 2009; 1280: 137-147.

TANOUS D, BRASEN JH, CHOY K, WU BJ, KATHIR K, LAU A, CELERMAJER DS, STOCKER R. Probucol inhibits in-stent thrombosis and neointimal hyperplasia by promoting re-endothelialization. *Atherosclerosis.* 2006; 189: 342-349.

TANOUS D, HIME N, STOCKER R. Anti-atherosclerotic and anti-diabetic properties of probucol and related compounds. *Redox Rep.* 2008; 13: 48-59.

TARDIF JC, GREGOIRE J, L'ALLIER PL. Prevention of restenosis with antioxidants: mechanisms and implications. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2002; 2: 323-334.

TARDIF JC, GRÉGOIRE J, SCHWARTZ L, TITLE L, LARAMÉE L, REEVES F, LESPÉRANCE J, BOURASSA MG, L'ALLIER PL, GLASS M, LAMBERT J, GUERTIN MC. Effects of AGI-1067 and Probucol After Percutaneous Coronary Interventions. *Circulation.* 2003, 107: 552-558.

Taylor JM, Ali U, Iannello RC, Hertzog P, Crack PJ. Diminished Akt phosphorylation in neurons lacking glutathione peroxidase-1 (Gpx1) leads to increased susceptibility to oxidative stress-induced cell death. *J Neurochem.* 2005; 92: 283-293.

TAWARA K, TOMIKAWA M, ABIKO Y. Mode of Action of Probucol in Reducing Serum Cholesterol in Mice. *Japan J Pharmacol.* 1986; 40: 123-133.

TORRES LL, QUAGLIO NB, DE SOUZA GT, GARCIA RT, DATI LM, MOREIRA WL, LOUREIRO AP, DE SOUZA-TALARICO JN, SMID J, PORTO CS, BOTTINO CM, NITRINI R, BARROS SB, CAMARINI R, MARCOURAKIS T. Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2011; 26: 59-68.

UEHARA Y, SHIMIZU H, SATO N, SHIMOMURA Y, MORI M, KOBAYASHI I. Probucol partially prevents development of diabetes in NOD mice. *Diabetes Res.* 1991; 17: 131-134.

URSINI F, HEIM S, KIESS M, MAIORINO M, ROVERI A, WISSING J, FLOHE L. *Science*. 1999; 285: 1393-1396.

UTSUNOMIYA H, KOMATSU N, YOSHIMURA S, TSUTSUMI Y, WATANABE K. Exact ultrastructural localization of glutathione peroxidase in normal rat hepatocytes: advantages of microwave fixation. *J Histochem Cytochem*. 1991; 39: 1167-1174.

UYLINGS HB, DE BRABANDER JM. Neuronal changes in normal human aging and Alzheimer's disease. *Brain Cogn*. 2002; 49: 268-276.

VAN BEEK AH, CLAASSEN JA. The cerebrovascular role of the cholinergic neural system in Alzheimer's disease. *Behav. Brain Res*. 2011; 221: 537-542.

VAN DAM D, DE DEYN PP. Drug discovery in dementia: the role of rodent models. *Nat Rev Drug Discov*. 2006; 5: 956-970.

VAN REMMEN H, QI W, SABIA M, FREEMAN G, ESTLACK L, YANG H, MAO GUO Z, HUANG TT, STRONG R, LEE S, EPSTEIN CJ, RICHARDSON A. Multiple deficiencies in antioxidant enzymes in mice result in a compound increase in sensitivity to oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2004; 36: 1625-1634.

WALSH DM, SELKOE DJ. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2004; 44: 181-193.

WESTERMAN MA, COOPER-BLACKETER D, MARIASH A, KOTILINEK L, KAWARABAYASHI T, YOUNKIN LH, CARLSON GA, YOUNKIN SG, ASHE KH. The relationship between Ab and memory in Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2002; 22: 1858-1867.

XIONG H, CALLAGHAN D, JONES A, WALKER DG, LUE LF, BEACH TG, SUE LI, WOULFE J, XU H, STANIMIROVIC DB, ZHANG W. Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gammasecretase activities and Abeta production. *Neurobiol. Dis*. 2008; 29: 422-437.

YAMAMOTO A. A unique antilipidemic drug--probucol. *J Atheroscler Thromb*. 2008; 15: 304-305.

YAMASHITA S, BUJO H, ARAI H, HARABA-SHIBA M, MATSUI S, FUKUSHIMA M, SAITO Y, KITA T, MATSUZAWA Y. Long-term probucol treatment prevents secondary cardiovascular events a cohort study of patients with heterozygous familial hypercholesterolemia in Japan. *J Atheroscler Thromb*. 2008; 15: 292-303.



YAMASHITA S, MATSUZAWA Y. Where are we with probucol: a new life for an old drug? *Atherosclerosis*. 2009; 207: 16-23.

ZHU X, RAINA AK, ROTTKAMP CA, ALIEV G, PERRY G, BOUX H, SMITH MA Activation and redistribution of c-jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase in degenerating neurons in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2001; 76: 435-441.

ZIMETBAUM P, EDER H, FRISHMAN W. Probucol: pharmacology and clinical application. *J Clin Pharmacol*. 1990; 30: 3-9.



## 8.2. PRELIMINARES DO ESTÁGIO DE DOUTORADO SANDUÍCHE

Projeto CAPES/COFECUB

Doutorado Sanduíche (Março-Agosto 2012)

Coorientadora: prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rita Raisman-Vozari

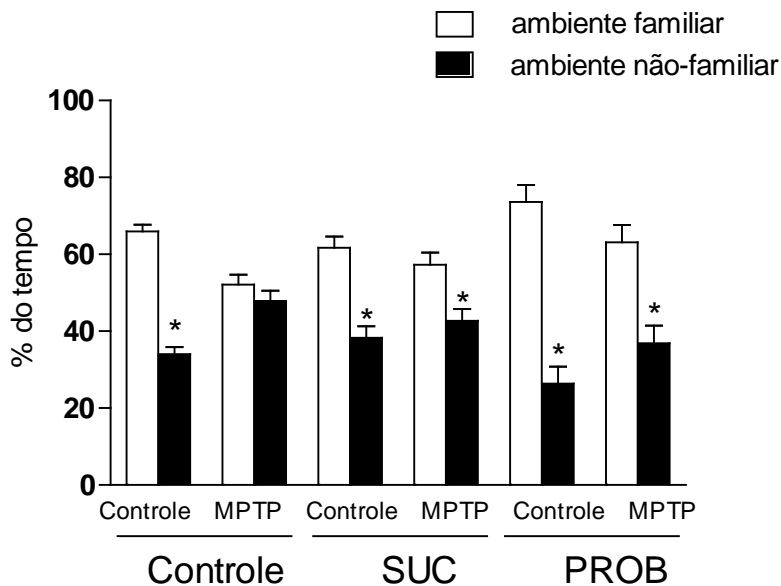
Centre de recherche de l'Institut du cerveau et de la moelle épinière (CRICM)

Thérapeutique Expérimentale de la Neurodégénérescence

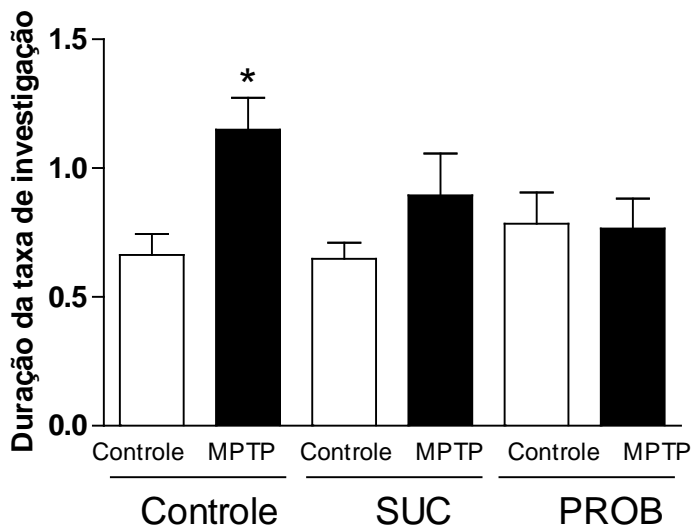
Hôpital de la Salpêtrière

INSERM UMR 975 – Université Pierre et Marie Curie

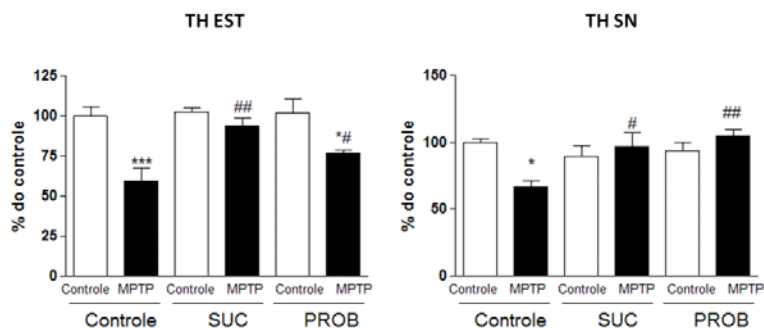
Paris- França



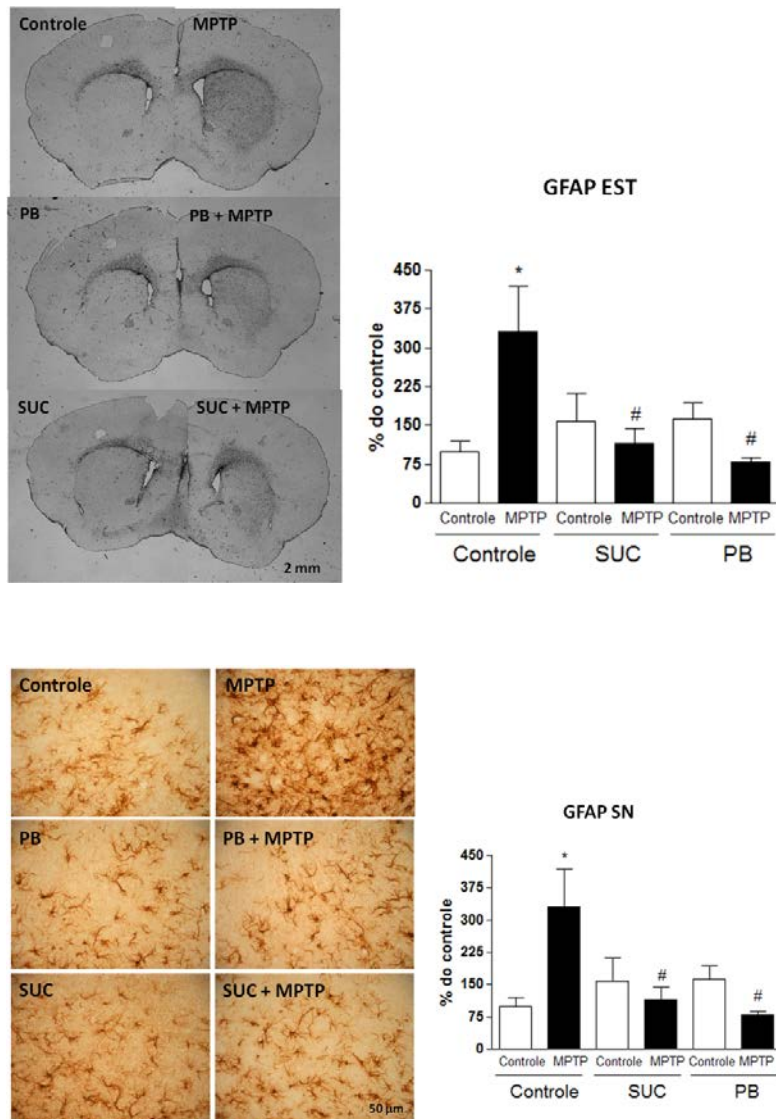
**Figura 1. Efeitos do probucol e do succinobucol sobre o prejuízo olfatório induzido pela administração intranasal de MPTP em camundongos.** Os animais foram pré-tratados com probucol ou succinobucol 10 mg/kg (via oral) por 45 dias e intoxicados com MPTP (1 mg/narina). Os animais controle tratados com veículo (salina) foram aptos em discriminar os dois ambientes, indicado pela diminuição no percentual de tempo no ambiente não-familiar. Entretanto, o tratamento com MPTP prejudicou essa função, e os animais exploraram de maneira semelhante os dois ambientes. O pré-tratamento com os compostos foi capaz de prevenir o dano induzido pelo MPTP. Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,05$  significativamente diferente quando comparado com o grupo controle (primeira barra no gráfico) pela análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido do teste *t* de Student;  $n = 9-12$ .



**Figura 2.** Efeitos do probucol e do succinobucol sobre o déficit no reconhecimento social induzido pela administração intranasal de MPTP em camundongos. Os animais controle tratados com veículo (salina) foram aptos a reconhecer o animal jovem quando resposto após 30 min, indicado pela menor taxa de duração da investigação. Porém, o tratamento com MPTP danificou a memória de reconhecimento dos animais aumentando o tempo de investigação ao animal jovem na segunda exposição. O pré-tratamento com os compostos durante 45 dias foi capaz de prevenir o dano induzido pelo MPTP. Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,05$  significativamente diferente quando comparado com o grupo controle pela análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido do teste Newman-Keuls;  $n = 9-12$ .

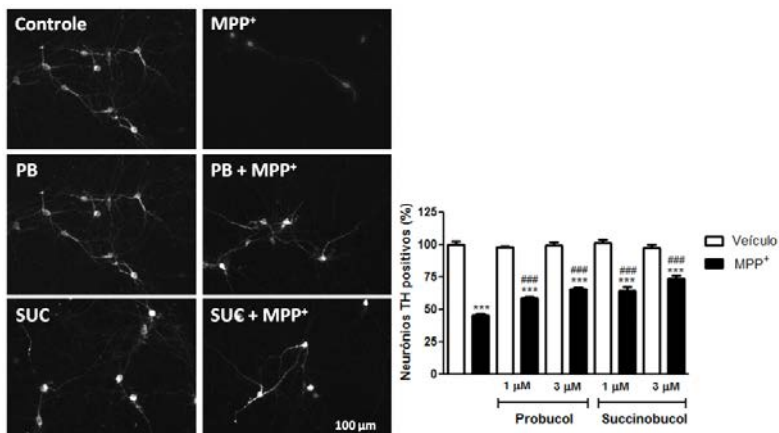


**Figura 3. Efeitos do probucol e do succinobucol sobre a degeneração nigro-estriatal induzida pela administração intranasal de MPTP em camundongos.** O tratamento com MPTP causou uma redução significativa na marcação para tirosina hidroxilase (TH) no estriado (EST) e na substância negra (SN). O pré-tratamento com os compostos preveniu a redução da marcação para TH (dados imunohistoquímicos) induzida pelo MPTP. Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,05$  significativamente diferente quando comparado com o grupo controle, #  $p < 0,05$  significativamente diferente quando comparado com o grupo MPTP, pela análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste Newman-Keuls;  $n = 4-5$ .



**Figura 4.** Efeitos do probucol e do succinobucol sobre a marcação para a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) induzida pela administração intranasal de MPTP em camundongos. O tratamento com MPTP causou um aumento significativo na marcação para GFAP no estriado (EST) e na substância negra (SN). O pré-tratamento com os compostos preveniu o aumento da marcação da GFAP

induzida pelo MPTP. Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,05$  significativamente diferente quando comparado com o grupo controle, #  $p < 0,05$  significativamente diferente quando comparado com o grupo MPTP, pela análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste Newman-Keuls;  $n = 4-5$ .



**Figura 5. Efeitos do probucol e do succinobucol sobre a degeneração dopaminérgica induzido pela MPP<sup>+</sup> em cultivos primários de neurônios mesencefálicos.** O tratamento com MPP<sup>+</sup> causou uma redução nas células marcadas (TH positivas). O pré-tratamento com os compostos preveniu parcialmente a redução da marcação de células TH positivas induzida pelo MPP<sup>+</sup>. Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,05$  significativamente diferente quando comparado com o grupo controle, #  $p < 0,05$  significativamente diferente quando comparado com o grupo MPP<sup>+</sup> pela análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste Newman-Keuls;  $n = 4-5$ .