

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**EFEITOS DO ZINCO SOBRE OS SISTEMAS DE
DEGRADAÇÃO DE PERÓXIDOS DE CÉLULAS NEURAIS**

Luiz Felipe de Souza

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal de Santa
Catarina para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica
Orientador: Prof. Dr. Alcir Luiz Dafré

Florianópolis, 2012

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

Souza, Luiz Felipe de
EFEITOS DO ZINCO SOBRE OS SISTEMAS DE DEGRADAÇÃO DE
PERÓXIDOS DE CÉLULAS NEURAIS [dissertação] / Luiz Felipe de
Souza ; orientador, Alcir Luiz Dafré - Florianópolis, SC,
2012.

64 p. ; 21cm

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

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Zinco. 3. Glutathione Redutase. 4.
Estresse oxidativo. 5. Peróxido. I. Dafré, Alcir Luiz . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica. III. Título.

**“Efeito do zinco sobre os sistemas de degradação de
peróxidos de células neurais”**

por

Luiz Felipe de Souza

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

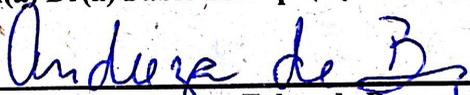
Banca Examinadora:



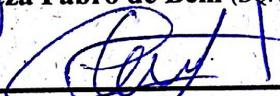
Prof(a) Dr(a) Alcir Luiz Dafre (BQA/CCB/UFSC)



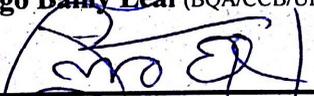
Prof(a) Dr(a) Fábio Klampert (BQA/ICBS/UFRGS)



Prof(a) Dr(a) Andreza Fabro de Bem (BQA/CCB/UFSC)



Prof(a) Dr(a) Rodrigo Bamy Leal (BQA/CCB/UFSC)



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

Florianópolis, 29 de junho de 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, meus pais e minha irmã por toda a minha educação e todo o apoio durante todos os anos da minha vida.

Ao meu orientador, Prof Dr. Alcir Luiz Dafre por ter me aceito como seu aluno, contribuindo muito para a minha formação com muita dedicação e paciência.

A professora Angélica Francesca Maris por ter ensinado e ajudado nas realizações do teste do Cometa.

Aos professores Andreza Fabro de Bem, Fábio Klamt, Rodrigo Bainy Leal e Marcelo Farina por aceitarem avaliar este trabalho

À todos do Laboratório de defesas celulares: Anderson, Ariana, Daiane, Marcela, Péricles, Mariana, Trevisan e Samira por toda a experiência, ajuda e amizade.

À Gecioni Loch Neckel e Claudia Pinto Figueiredo por terem gentilmente cedido às células que foram fundamentais para a realização do trabalho.

A todos os professores e alunos do programa de Pós Graduação em Bioquímica pela ótima experiência de vida.

À todos da colônia Celso Ramos de Frei Rogério e à todos do Kendo Floripa por todo companheirismo e ajuda durante os anos.

RESUMO

Zinco na sua forma iônica livre é mantido em concentrações muito baixas nas células de mamíferos. Em algumas vesículas sinápticas de neurônios glutamatérgicos, porém, ele pode ser encontrado em altas concentrações, aonde atua como um modulador iônico. Em situações patológicas, porém, o zinco livre pode se acumular no citosol nas células neurais provocando diversos efeitos tóxicos, tais como a inibição de enzimas. O zinco é capaz de inibir as enzimas antioxidantes glutationa redutase (GR) e tioredoxina redutase (TrxR), duas enzimas envolvidas na defesa celular contra oxidantes. Essa inibição, portanto, pode resultar em um decréscimo na degradação de peróxidos, levado a uma maior vulnerabilidade a danos oxidativos. O presente trabalho tem como objetivo investigar a relação da inibição das enzimas antioxidantes GR e TrxR, pela exposição de células neurais ao zinco, com a susceptibilidade destas células quando desafiadas com agentes oxidativos. Células derivadas de neuroblastoma (N2a), astroglioma (C6) e fatias de hipocampo de ratos adultos foram pré-incubadas com 100 μM de ZnCl_2 por 30 min, e em seguida expostas por uma hora a 100 μM de H_2O_2 ou 100 μM de peróxido de cumeno. O tratamento com ZnCl_2 provocou uma queda na atividade da GR nos 3 modelos, sendo que as células C6 foram mais afetadas (77% de inibição comparado com 30-35 % nos outros modelos). A enzima TrxR também foi inibida em 30% nas células C6, enquanto nas células N2a e fatias de hipocampo, esse efeito não foi observado. O tratamento com ZnCl_2 diminuiu a taxa de consumo de H_2O_2 e CHP nas células C6, enquanto nas células N2a somente o consumo de H_2O_2 foi afetado. Em células N2a, tanto o tratamento com ZnCl_2 como com H_2O_2 provocaram uma diminuição na viabilidade celular, porém a combinação de ambos não aumentou esta toxicidade. As células C6 foram resistentes aos efeitos tóxicos dos peróxidos e ZnCl_2 , porém, o pré-tratamento com ZnCl_2 aumentou a susceptibilidade dessas células à toxicidade de ambos os peróxidos, diminuindo a viabilidade, aumentando a permeabilidade celular e o dano ao DNA. O ZnCl_2 não aumentou a vulnerabilidade das fatias de hipocampo à toxicidade dos peróxidos, porém, quando estas foram expostas a 1 mM de H_2O_2 , em combinação com ZnCl_2 , houve queda na viabilidade celular na mesma proporção causada pelo pré-tratamento com BCNU, um inibidor da GR. Neste caso, supõe-se que esta queda na viabilidade é devido a inibição da GR. Em conclusão, os dados apresentados

demonstram que, apesar da alta susceptibilidade das células neuronais (N2a) ao $ZnCl_2$ e aos peróxidos, a inibição da GR não aumentou esta sensibilidade. Por outro lado, as células derivadas de astrócitos (C6) foram mais resistentes ao $ZnCl_2$ e aos peróxidos, porém a inibição da GR e da TrxR pelo tratamento com zinco aumentaram a citotoxicidade de ambos os peróxidos. Nas células C6, o sinergismo entre a inibição das enzimas antioxidantes e a toxicidade aos peróxidos, provavelmente se deve a menor capacidade em degradar peróxidos. Desta forma, nossos dados indicam que a inibição de enzimas antioxidantes GR e TrxR é um fator importante associado a sua toxicidade em células neurais.

Palavras chaves: Glutationa redutase, Tio redoxina redutase, Zinco, Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Zinc in its free, ionic form is kept in very low concentrations in mammalian cells. In some synaptic vesicles in glutamatergic neurons, however, it can be found in high concentrations where it acts as an ionic modulator. In pathological situations, however, this free zinc can accumulate in the cytosol of neural cells producing a myriad of toxic effects, such as the inhibition of enzymes. Zinc can inhibit glutathione reductase (GR) and thioredoxin reductase (TrxR), both antioxidant enzymes that are crucial for cell protection against oxidants. Therefore, a disturbance in the activity of these enzymes hinder peroxide degradation and increases vulnerability to oxidative damage. The present work aims to investigate the relation between the inhibition of these enzymes by zinc and the susceptibility of neuronal and astrocytic cells, as well as hippocampal slices, to H₂O₂ and cumene peroxide (CHP). Cells derived from neuroblastoma (N2a), astroglyoma (C6) and hippocampal slices were pre-incubated with 100 μM of ZnCl₂ for 30 min, and then exposed to 100 μM of H₂O₂ or CHP for 1h. Treatment with ZnCl₂ decreased GR activity in the three models, but this effect was higher in C6 cells (70 % of inhibition in comparison to 30-35 % of inhibition in the other models). TrxR was inhibited by 30 % in C6 cells, while in N2a and hippocampal slices this effect was not observed. Treatment with Zn decreased H₂O₂ and CHP consumption rate in C6 cells, but only H₂O₂ consumption rate was reduced in N2a cells. Both ZnCl₂ and H₂O₂ treatment induced a decrease in cellular viability in N2a cells, but their combination did not enhance this toxicity. C6 cells were more resistant to toxic effects of ZnCl₂ and peroxides, however, the pre-incubation with ZnCl₂ increased cell vulnerability to both peroxides, decreasing cell viability, increasing membrane permeability and DNA damage. ZnCl₂ did not increased vulnerability of hippocampal slices to toxic effects of peroxides, but when these cells were exposed to 1 mM of H₂O₂ after the ZnCl₂ pre-treatment, a decrease in cell viability was observed in the same proportion as the effect caused by the pre-treatment with BCNU, an inhibitor of GR, indicating that this effect is likely due to GR inhibition. In conclusion, this data demonstrate that despite the high susceptibility of N2a cells to ZnCl₂ and H₂O₂, the zinc-induced GR inhibition did not increased this vulnerability. In contrast, C6 cells were more resistant to ZnCl₂ and peroxides, but the inhibition of GR and TrxR by zinc treatment highly increased the cytotoxicity of

both peroxides. Hippocampal slices were more resistant than the cell cultures to the toxic effects of the treatments, but when exposed to higher doses of H_2O_2 , Zn was able to sensitize the cells to peroxide toxicity. In C6 cells, the synergism between the inhibition of enzymes and peroxide toxicity probably is related to the decreased capacity to metabolize peroxides. Therefore our data suggest that the inhibition of the antioxidant enzymes GR and TrxR by zinc is an important factor associated with its toxicity in neural cells.

Keywords: glutathione reductase, thioredoxin reductase, zinc, oxidative stress, brain

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Metabolismo da glutationa.....	07
Figura 2. Ciclo da peróxiredoxina 2-Cys típica.....	10
Figura 3. Transporte sináptico do zinco.....	16
Figura 4. Comparação das defesas antioxidantes de diferentes células neurais.....	26
Figura 5. Inibição da GR e TrxR pela exposição ao ZnCl ₂ sobre diferentes modelos de células neurais.....	27
Figura 6. Taxa de degradação de peróxidos pelos três modelos neurais tratados com 100 µM de ZnCl ₂	30
Figura 7. Efeito do ZnCl ₂ na viabilidade celular de culturas neurais expostas a H ₂ O ₂ ou CHP.....	32
Figura 8. Efeito do ZnCl ₂ e BCNU na viabilidade fatias de hipocampo expostas a H ₂ O ₂	34
Figura 9. Efeito do ZnCl ₂ na integridade da membrana plasmática de culturas neurais expostas a H ₂ O ₂ ou CHP.....	35
Figura 10. Danos no DNA de células neurais tratadas com ZnCl ₂ e expostas a H ₂ O ₂ ou CHP.....	37
Tabela 1. Consumo de peróxido nos diferentes modelos neurais.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

- OH – Radical hidroxil
- $^1\text{O}_2$ – Oxigênio singlet
- BSA – Albumina de soro bovino
- CAT – Catalase
- CHP – Peróxido de cumeno
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- DTNB – Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ERO – Espécies reativas de oxigênio (ROS – Reactive oxygen species)
- G6PDH – Glicose 6-fosfato desidrogenase
- GCL – Glutamato-cisteína ligase
- GGT – γ -glutamil transpeptidase
- GPx – Glutaciona peroxidase
- GR – Glutaciona redutase
- GRx- Glutaredoxina
- GSH – Glutaciona na forma reduzida
- GSSG – Dissulfeto de glutaciona, ou glutaciona oxidada
- GST – Glutaciona S-transferase
- H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio
- NAD^+ – Dinucleotídeo de nicotinamida adenina, forma oxidada
- NADPH – Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma reduzida
- NO – Óxido nítrico
- $\text{O}_2^{\bullet-}$ – Ânion superóxido
- OH $^-$ – Ânion hidroxila
- ONOO^- – Peroxinitrito
- PARP1 – poli-(ADP-ribose)-polimerase 1
- Prx – Peroxirredoxina
- ROO^\bullet – Radical peroxil
- SDS – Dodecil sulfato de sódio
- SOD – Superóxido dismutase
- SOD-CuZn – Superóxido dismutase cobre-zinco
- SOD-Mn – Superóxido dismutase manganês
- TNB – Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
- TrxR – Tiorredoxina redutase
- Xe - Xenobiontes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Espécies reativas de oxigênio.....	1
1.2 Defesas antioxidantes	3
1.2.1 Metabolismo da glutathiona	5
1.2.2 Sistema tioredoxina/peroxirredoxina	8
1.3 Espécies reativas de oxigênio e neurotoxicidade	11
1.4 Degradação de peróxidos por células neurais.....	12
1.5 Zinco	14
1.5.1. Zinco no sistema nervoso central.....	14
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivos específicos	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1 Animais.....	20
4.2 Preparação das fatias de hipocampo	20
4.3 Cultura celular	20
4.4 Tratamentos	21
4.5 Análise da atividade de enzimas antioxidantes.....	21
4.5.1 Glutathiona peroxidase	21
4.5.2 Glutathiona Redutase.....	22
4.5.3 Tioredoxina redutase	22
4.6 Análise da viabilidade mitocondrial	22
4.7 Permeabilidade da membrana	23
4.8 Taxa de degradação de peróxidos	23
4.9 Análises estatísticas	23
5. RESULTADO.....	24
5.1 Efeito da exposição ao ZnCl ₂ sobre as defesas antioxidantes.....	24

5.2 Efeito do tratamento com $ZnCl_2$ sobre a capacidade das células neurais de detoxificar peróxidos exógenos	27
5.3 Viabilidade celular	29
5.4 Integridade da membrana	33
5.5 Danos no DNA.....	35
6. DISCUSSÃO.....	37
6.1 Inibição das enzimas antioxidantes	37
6.2 Consumo de peróxidos.....	38
6.3 Viabilidade celular	41
6.4 Permeabilidade da membrana	42
6.5 Dano no DNA	43
6.6. Considerações finais	44
7. CONCLUSÕES.....	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

1. INTRODUÇÃO

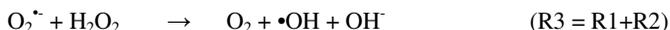
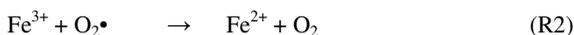
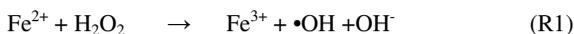
1.1 Espécies reativas de oxigênio

A utilização do oxigênio como o aceptor de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial durante a fosforilação oxidativa, garantiu um grande aumento na produção de ATP. Comparado ao metabolismo anaeróbico, a respiração, que está associada à maior oferta energética, permitiu o aumento tanto no tamanho quanto na complexidade celular. Ao mesmo tempo em que o oxigênio desempenha um papel fundamental no processo de geração de energia dos seres aeróbicos, produtos de seu metabolismo, tais como os radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ERO), podem ser extremamente deletérios, causando danos em diversas estruturas celulares (Halliwell; Gutteridge, 2007; Valko *et al.*, 2007).

Radicais livres podem ser definidos como qualquer molécula com existência independente contendo um ou mais elétrons desemparelhados (Halliwell; Gutteridge, 2007). Esses elétrons desemparelhados deixam os átomos ou moléculas instáveis, podendo ser altamente reativas. A redução do O_2 para H_2O é precedida pela formação de ERO e não radicalares de oxigênio e essas, juntamente com as espécies reativas de nitrogênio, constituem as moléculas reativas de maior relevância biológica (Valko *et al.*, 2007). Dentre as ERO podemos encontrar espécies radicalares como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila (HO^{\bullet}) e o radical peroxila (HOO^{\bullet}); e não radicalares como o H_2O_2 e o oxigênio singleto (1O_2). Apesar de todos serem tratados usualmente como uma só entidade, cada ERO possui características e capacidades reativas diferentes. O ânion superóxido é carregado negativamente, não ultrapassa membranas biológicas, e sua ação é restrita ao local de produção. Entretanto, tem se aventado a possibilidade de sua passagem por canais aniônicos, tais como os de cloreto (Mumbengegwi *et al.*, 2008). O $O_2^{\bullet-}$ é capaz de oxidar grupamentos de ferro-enxofre de proteínas, e reage rapidamente com outros radicais como o $\bullet NO$, formando o peroxinitrito ($ONOO^-$), uma molécula altamente reativa (Halliwell; Gutteridge, 2007). O H_2O_2 possui uma capacidade oxidante inferior ao do $O_2^{\bullet-}$, porém é altamente permeável às membranas, podendo oxidar moléculas longe do local onde foi formado (Imlay, 2003; Winterbourn; Hampton, 2008). O maior problema gerado pelo H_2O_2 ocorre pela sua reação com o Fe^{2+} ou outros

metais traço, exemplificado através da reação de Fenton (R1), gerando o radical $\bullet\text{OH}$.

O metabolismo normal das células depende de diversas reações de oxido-redução. Para tanto, várias proteínas possuem grupos prostéticos contendo metais de transição que possibilitam tais reações. Entre estes, o efeito do ferro e do cobre são mais conhecidos. Ao serem oxidados, os grupamentos de ferro-enxofre de proteínas podem liberar o íon Fe^{2+} . O ferro livre contribui consideravelmente para a formação de ERO, leva a danos oxidativos e está envolvido em diversas patologias (Halliwell; Gutteridge, 2007; Thompson; Shoham; Connor, 2001; Uranga; Giusto; Salvador, 2009; Valko; Morris; Cronin, 2005). O $\text{O}_2^{\bullet-}$ pode ainda reduzir o Fe^{3+} (R2) formado na reação de Fenton, participando na formação de $\bullet\text{OH}$ pela reação de Haber-Weiss (R3). O radical $\bullet\text{OH}$ é altamente reativo, possuindo uma meia vida de aproximadamente 10^{-9} s, podendo reagir com virtualmente qualquer molécula biológica (Halliwell; Gutteridge, 2007; Valko *et al.*, 2007).



As ERO são produzidas continuamente durante o metabolismo normal da célula, mas também podem ser geradas por fontes externas como radiação ionizante, luz ultravioleta ou xenobióticos. Entre os processos fisiológicos com maior produção de ERO temos a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, gerando $\text{O}_2^{\bullet-}$ e o catabolismo de ácidos graxos nos peroxissomo, gerando H_2O_2 . Durante a fosforilação oxidativa, nos complexos I e III, aproximadamente 1-3 % dos elétrons reagem diretamente com o oxigênio, gerando $\text{O}_2^{\bullet-}$ que é rapidamente convertido espontaneamente ou enzimaticamente para H_2O_2 (Boveris; Chance, 1973; Halliwell; Gutteridge, 2007; Imlay, 2003). As ERO também podem ser produzidas como produtos ou subprodutos da atividade de enzimas, tais como NADPH oxidase, xantina oxidase, citocromo P450, entre outros.

Enquanto a exposição de biomoléculas a altas concentrações de ERO pode resultar em sérios danos às estruturas celulares, níveis baixos a moderados de ERO estão envolvidos na regulação do metabolismo normal da célula, agindo como “segundo mensageiro” em diversas vias

de sinalização. Este mecanismo de sinalização celular é conhecido como regulação redox (Dröge, 2002). A sinalização redox é responsável por modular diversas funções celulares. Oxidantes podem ativar ou inativar fatores de transcrição, proteínas canais, proteínas cinases e fosfatases, além de aumentar a expressão de proteínas antioxidantes e proteínas de reparo (Winterbourn; Hampton, 2008). O H_2O_2 é uma das ERO mais importantes na sinalização celular, podendo oxidar tióis protéicos com alta reatividade, os quais geralmente possuem baixo pKa. Entretanto, em altas concentrações, as ERO acabam atacando estruturas celulares com menos especificidades, tornando-se tóxicas (D'Auréaux; Toledano, 2007; Winterbourn; Hampton, 2008).

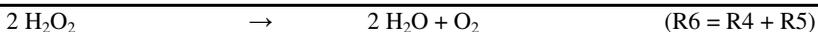
Nesse sentido a homeostasia redox celular é mantida sob rígido controle pelo balanço na quantidade de ERO produzida, bem como de sua remoção por antioxidantes. Um aumento na produção de ERO e/ou uma diminuição das defesas antioxidantes pode levar a uma perturbação na sinalização redox normal e estresse oxidativo (Chong; Li; Maiese, 2005; Sies, 1997). Durante o estresse oxidativo as ERO podem oxidar grupos tióis de proteínas, podendo levar a formação de pontes dissulfeto, culminando na inativação das mesmas. As ERO também podem oxidar ácidos graxos de membrana, formando compostos tóxicos como o malondialdeído e 4-hidroxinonenal, os quais também podem sinalizar para uma reposta celular, além de formarem conjugados com macromoléculas, o que pode resultar em processos mutagênicos e carcinogênicos (Halliwell e Gutteridge, 2007; Valko et al., 2007). De fato, as ERO contribuem para danos e para a morte celular em diversas situações patológicas, como isquemia-reperfusão, inflamação, câncer, doenças neurodegenerativas (Abramov; Scorziello; Duchon, 2007; Andersen, 2004; Dalle-Donne et al., 2007; Valko et al., 2007), além de estar envolvido no processo de envelhecimento celular (Maher, 2005).

1.2 Defesas antioxidantes

Um antioxidante pode ser definido como 'qualquer substância que, quando presente em baixas quantidades se comparada ao substrato oxidável, atrasa ou previne a oxidação desse substrato' (Halliwell et al., 1995). Os antioxidantes têm a função de interromper as cascatas de oxidação provindas da quebra da homeostasia redox. Estas defesas antioxidantes podem ser não enzimáticas, como o ácido ascórbico (Vitamina C), o α -tocoferol (Vitamina E), flavonóides, carotenóides,

glutationa (GSH), etc.; ou enzimáticas, que incluem a glutaciona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidoredoxina (Prx), tioredoxina redutase (TrxR), entre outras (Halliwell; Gutteridge, 2007).

A SOD é uma metaloenzima responsável pela conversão do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 em uma reação catalizada por metais de seu sítio ativo. Nos eucariotos são encontradas 3 tipos de SOD: uma isoforma citoplasmática que possui cobre e zinco no seu sítio catalítico (Cu/Zn-SOD), uma isoforma dependente de manganês (Mn-SOD) localizada na mitocôndria, e uma Cu/Zn-SOD extracelular (Dhar; St. Clair, 2012; Halliwell; Gutteridge, 2007). No caso da Cu/Zn-SOD, o zinco, apesar de importante para a função enzimática, possui um papel estrutural. A Mn-SOD por sua vez utiliza o Mn^{3+} para a reação ao invés do cobre. Camundongos desprovidos do gene para MnSOD apresentam redução no tempo de vida (vivem apenas aproximadamente 3 semanas), neurodegeneração dos neurônios dos ganglios basais e tronco encefálico, anemia e danos mitocondriais em neurônios e células cardíacas (Lebovitz *et al.*, 1996). Estes fatos demonstram a importância da SOD na proteção contra ERO derivados da mitocôndria. A SOD e outras enzimas, além de processos não enzimáticos, geram H_2O_2 como subproduto de reações redox. O H_2O_2 pode ser degradado por dois tipos de enzimas, as catalases e as peroxidases. A catalase é um homotetrâmero de 240 kDa, na qual cada uma das subunidades contém um grupo Heme responsável pela sua capacidade oxirredutora. O ciclo catalítico da catalase reduz o H_2O_2 a duas moléculas de água em 2 passos (R4 e R5), cuja soma está representada na reação R6:



As constantes de reação são $1,7 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ e $2,6 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ para as reações 1 e 2 respectivamente, mostrando que a catalase é uma das enzimas com um dos ciclos mais rápidos encontradas na natureza (Halliwell; Gutteridge, 2007). Sua afinidade pelo H_2O_2 , porém, é baixa, sendo seu K_m na ordem de 1,1 M. Por causa de sua grande V_{max} é muito difícil saturar a catalase, e na presença de grandes concentrações de

peróxidos, a catalase sofre oxidações, levando a perda de sua atividade. Em mamíferos, a catalase se localiza quase que exclusivamente nos peroxissomos, aonde H_2O_2 é gerado por diversas oxidases. Então, a ação da catalase é restrita pela difusão do H_2O_2 , já que ERO são produzidos em outros sítios celulares como a mitocôndria.

1.2.1 Metabolismo da glutatona

A glutatona (γ -glutamil-cisteinil-glicina) é um tripeptídeo formado a partir da junção especial do aminoácido glutamato com uma cisteína numa reação ATP-dependente. Esta ligação peptídica especial é feita no carbono gama e catalizada pela enzima γ -glutamilcisteína sintetase ou glutamato-cisteína ligase (GCL). Posteriormente a glicina é adicionada pela glutatona sintetase, também por uma reação dependente de ATP. A indução da GCL por oxidantes é uma das respostas celulares à sinalização redox das mais conhecidas.

A GSH é o tiol de baixo peso molecular mais abundante em tecidos animais e vegetais, com concentrações variando entre 0,5 e 10 mM, sendo que sua cisteína possui o grupo tiol responsável pela sua capacidade antioxidante. A GSH é um potente agente redutor, e isso combinado com as altas concentrações intracelulares confere a essa molécula a capacidade de eliminar ERO, sendo oxidado preferencialmente, preservando outras estruturas celulares importantes.

A GSH possui diversas funções metabólicas importantes, tais como a redução do ácido ascórbico e do α -tocoferol para seu estado ativo, o transporte de aminoácidos pela membrana plasmática, detoxificação de xenobióticos, além de servir como cofator de diversas enzimas antioxidantes (Halliwell; Gutteridge, 2007; Maher, 2005; Valko *et al.*, 2007).

A glutatona S-transferase (GST), é uma enzima que participa no metabolismo da GSH, conjugando a GSH a uma série de substratos eletrofílicos, tais como herbicidas, pesticidas e xenobióticos. Sua maior predominância em mamíferos é no fígado, constituindo cerca de 10% das proteínas. Existem cerca de 10 isoformas com alta especificidade para GSH, mas esta especificidade é variável para o substrato eletrofílico (Dourado; Fernandes; Ramos, 2008).

A GPx, tem a função de degradar peróxidos orgânicos e de hidrogênio, utilizando a GSH como doador de elétrons. Em mamíferos existem pelo menos quatro isoformas desta enzima (GPx 1-4), sendo

que todas contêm selenocisteína no seu sítio ativo, e são dependentes da suplementação de selênio pela dieta. A isoforma predominante é a citosólica (GPx1), mas é encontrada também na mitocôndria, aonde tem a função de remover o H_2O_2 formado, já que essa organela praticamente não possui catalase (Maher, 2005; Sokolova *et al.*, 2001). A importância fisiológica da GPx1 é controversa. Enquanto alguns trabalhos mostram que camundongos desprovidos do gene para GPx1 são completamente normais, outros mostram que a redução dos níveis (*knock-down*) desta enzima deixa os animais mais vulneráveis a alguns agentes oxidantes, tais como o paraquat e peróxido de hidrogênio (Cheng *et al.*, 1997; Haan *et al.*, 1998). Em trabalho do grupo (Farina *et al.*, 2009), foi possível demonstrar que a superexpressão de GPx1 protege cultura neuronais contra toxicidade do mercúrio. Portanto, é possível que a ação da GPx1 seja diferente, dependendo do mecanismo de ação de diferentes agentes pró-oxidantes. A importância da GPx4 na proteção das células frente a oxidantes já é bem melhor caracterizada. A isoforma GPx4 é um monômero de 20-22 kDa e é a única GPx que é capaz de degradar hidroperóxidos lipídicos inseridos nas membranas, mas sua atividade nos tecidos é menor do que a GPx1. Camundongos sem o gene para a GPx4 (GPx4^{-/-}) morrem ainda no útero, e células de animais heterozigotos (GPx4^{+/-}), quando cultivadas, apresentam maior vulnerabilidade a agentes pró-oxidantes como paraquat e H_2O_2 (Yant *et al.*, 2003). Cultura de neurônios GPx4^{+/-} ainda apresenta maior peroxidação lipídica e acúmulo de β -amilóide, demonstrando a importância desta enzima e das ERO em doenças neurodegenerativas (Chen *et al.*, 2008). A GPx2 é encontrada no sistema gastrointestinal, aonde pode degradar peróxidos provenientes da alimentação, enquanto a GPx3 é encontrada no plasma. Não se sabe se a GPx3 possui ação peroxidática, já que os níveis de GSH no plasma são baixos (Halliwell; Gutteridge, 2007)

A glutiona redutase (GR) é responsável pela recuperação do dissulfeto da glutiona (GSSG) para a sua forma reduzida e ativa, GSH. A GR é um homodímero formada por subunidades idênticas de 52,4 kDa, cada uma com um FAD no seu sítio ativo. A GR catalisa a transferência de elétrons do NADPH para o FAD, que em seguida reduz uma ponte dissulfeto em seu sítio catalítico. Os grupamentos tiólicos formados reduzem a GSSG, regenerando, assim, os níveis de GSH. Ao formar GSH a ponte dissulfeto na enzima é novamente formada (Halliwell; Gutteridge, 2007).

O par GSH/GSSG atua como o maior tampão redox, sendo um indicativo do estado oxidativo da célula. A taxa GSH/GSSG normalmente é mantida maior que 100/1. Essa taxa é crítica para a manutenção da viabilidade celular e do estado redox dos tióis protéicos (Dalle-Donne *et al.*, 2007; Dröge, 2002; Valko *et al.*, 2007). Durante insulto oxidativo, os níveis de GSSG podem se elevar, e a reação da GSSG com tióis protéicos pode resultar na formação de disulfetos entre a glutatona e as proteínas, os chamados disulfetos mistos ou S-glutationilação. A S-glutationilação protege os tióis protéicos contra oxidações irreversíveis e pode ser revertida, entre outras, pela glutaredoxina (Grx) (Dalle-Donne *et al.*, 2007). A S-glutationilação, porém, também ocorre em outras condições fisiológicas normais, pela adição de GSH a resíduos de cisteína de baixo pKa, servindo como um importante mecanismo de regulação redox. A glutatona está envolvida no crescimento, diferenciação celular, funções do citoesqueleto, entre outras (Dalle-Donne *et al.*, 2007; Winterbourn; Hampton, 2008). Segundo essa nova visão, pequenos aumentos na concentração de GSSG poderiam levar a S-glutationilação de tióis protéicos específicos e esse evento poderia levar a ativação ou inativação de proteínas, tal como uma regulação dependente de cinases. Uma representação do sistema da glutatona está descrito na Figura 1. Estudos recentes demonstraram que a glutatona pode ser mediada pela ação direta de ERO ou espécies reativas de nitrogênio, sem a necessidade de acúmulo de GSSG. Estes dados aumentam ainda mais a relevância da glutatona como um mecanismo fisiológico ou fisiopatológico (Dalle-Donne *et al.*, 2007).

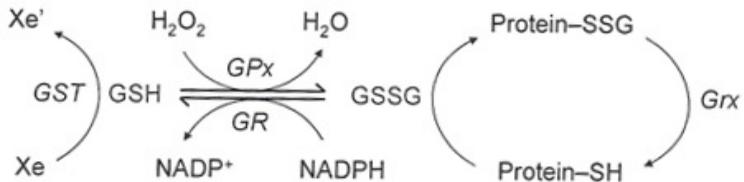


Figura 1. Metabolismo da glutatona. A GSH é utilizada em diversas reações, tais como a detoxificação de xenobióticos (Xe) catalizada pela GST, ou a degradação de peróxidos catalisada pela GPx, gerando GSSG. O aumento de GSSG leva a S-glutationilação de resíduos de

cisteína em proteínas, que pode ser revertido pela Grx. A GSSG é reduzida pela GR utilizando o NADPH como doador de elétrons. Retirado de (Low, 2007).

1.2.2 Sistema tioredoxina/peroxirredoxina

A tioredoxina (Trx) possui um grande potencial redutor, servindo como um doador de elétrons em reações de oxiredução, trocas tióis-dissulfeto, entre diversas outras funções. Trx é um peptídico de 12 kDa ubiquamente expresso que apresenta a sequência conservada -Cys-Gly-Pro-Cys- em seu sítio ativo. Durante seu ciclo catalítico, os grupamentos tióis do seu sítio ativo se oxidam formando uma ponte dissulfeto intramolecular (Fig 2). Mamíferos possuem pelo menos três tipos de Trx: a Trx1 é expressa no citosol, a Trx2 na mitocondrial e a spTrx é expressa nos espermatozoides (Holmgren; Lu, 2010; Maulik; Das, 2008).

Assim como a GSH, a Trx depende do NADPH com doador de elétrons para completar seu ciclo. A tioredoxina redutase (TrxR) é formada por um grupo de flavoproteínas homodiméricas que catalizam a transferência de elétrons do NADPH para a Trx. As TrxR de mamíferos são muito parecidas com as GR, porém, além do grupo FAD, as TrxR dependem de uma seleno-cisteína no motivo C-terminal para o funcionamento de sua ação catalítica (Arnér, 2009).

As peroxiredoxinas (Prx) são uma família de enzimas antioxidantes que estão envolvidas na degradação de diversos peróxidos, como H₂O₂, peróxidos orgânicos e peróxinitrito. Ao contrário das outras peroxidases encontradas na natureza, essa molécula não apresenta nenhum grupo prostético ou metais de transição para realizar a reação peroxidática, como é o caso da catalase que possui um grupo heme, ou da GPx dependente de selênio. Ao contrário destas, a Prx utiliza um resíduo de cisteína no seu sítio ativo, denominado cisteína peroxidática (Flohé and Harris, 2007).

As Prx podem ser divididas em dois grupos: 1-Cys e 2-Cys, dependendo do número de cisteínas envolvidas no processo catalítico. As 2-Cys Prx possuem a Cys peroxidática e a Cys de resolução, enquanto a 1-Cys possui somente a Cys peroxidática. As 2-Cys Prx ainda podem ser divididas em típicas e atípicas, dependendo do mecanismo da ação (Flohé and Harris, 2007; Wood *et al.*, 2003). As 2-

Cys Prx típicas se apresentam como homodímeros associados não covalentemente, sendo suas subunidades orientadas no sentido inverso, ou seja, a porção N-terminal de uma está voltada para a C-Terminal da outra, sendo que a Cys peroxidática de uma das subunidades se sobrepõe com a Cys de resolução da segunda (Flohé and Harris, 2007). Nas 2-Cys Prx a cisteína peroxidásica interage com outros resíduos da vizinhança e que tem posição conservada evolutivamente, principalmente de argininas. Estas argininas reduzem o pKa da cisteína peroxidásica, estabilizando o ânion tiolato, o que confere alta reatividade a estas cisteínas. As 1-Cys Prx, em contrapartida, se apresentam na forma ativa como um monômero, não possuindo a Cys de resolução. A cisteína peroxidásica das 1-Cys Prxs são reduzidas por agentes tiólicos, tais como a GSH.

Todas as Prx possuem o primeiro passo de sua ação de peroxidase em comum, na qual a Cys peroxidática ataca o peróxido e é oxidada em ácido sulfênico (-SOH). Em seguida os mecanismos de recuperação diferem. Nas 2-Cys Prx típicas, como demonstrado na Figura 2, o ácido sulfênico é atacado pela Cys de resolução da segunda subunidade, formando uma ponte disulfeto entre as duas subunidades (dímero). No caso das 2-Cys atípicas, essas se apresentam como monômeros funcionais, e após a oxidação da Cys peroxidática, é formada uma ponte disulfeto intramolecular com a sua própria Cys de resolução. Ambas as 2-Cys típicas e atípicas podem ser reduzidas utilizando a tioredoxina como doador de elétrons (Wood *et al.*, 2003).

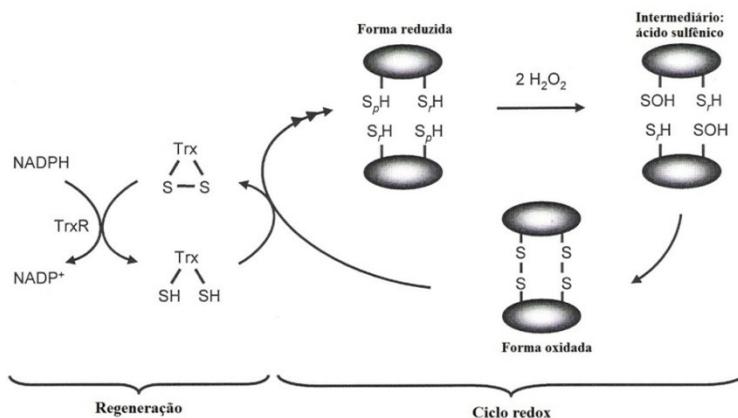


Figura 2. Ciclo da 2-Cys peróxiredoxina típica. A Cys peroxidática é oxidada para a forma de ácido sulfênico, que é, então, atacado pela Cys de resolução da outra subunidade da molécula, formando uma ponte disulfeto que pode ser revertida pela tioredoxina. A forma oxidada da tioredoxina pode ser reduzida pela TrxR às custas de NADPH (Adaptado de (Low, 2007)).

Uma característica especial das Prxs é a capacidade da Cys peroxidática ficar em um estado superoxidado. Quando há uma maior produção de H₂O₂ o ácido sulfênico pode ser oxidado novamente formando ácido sulfínico (-SO₂) ou sulfônico (-SO₃). Nesse estado a Prx não pode ser reduzida pela tioredoxina, sendo então inativada. A redução do ácido sulfínico até pouco tempo era considerada impossível, porém foi demonstrado que a superoxidação pode ser reversível *in vivo*, através de uma enzima denominada sulfiredoxina (Woo *et al.*, 2003). A superoxidação tem sido proposta como um mecanismo de regulação redox, na qual a inativação da Prx proporcionaria um moderado acúmulo de H₂O₂ intracelular, sendo um sinalizador para diversas vias de transdução de sinal (Kang *et al.*, 2005). Outras funções que tem sido atribuída a estas enzimas são a participação na diferenciação celular, proliferação, e a capacidade de atuar como chaperonas (Boulos *et al.*, 2007).

Em mamíferos são encontrados 6 isoformas de Prx: A Prx-1 e -2, encontradas no citoplasma, a Prx-3 mitocondrial, a Prx-4 presente no citoplasma e no espaço extracelular, a Prx-5 presente na mitocôndria,

citoplasma, peroxissomos e núcleo e a Prx-6 citoplasmática (Wood *et al.*, 2003).

No sistema nervoso central, a presença, a concentração e o tipo celular é característico para cada uma das diferentes isoformas da Prx (Flohé and Harris, 2007; Jin *et al.*, 2005). Diversas doenças podem modular a expressão dessas enzimas: na doença de Alzheimer, por exemplo, foi encontrado um aumento da expressão do Prx1 e 2, enquanto a expressão de Prx3 foi reduzida, indicando que a Prx possui uma importante participação no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Flohé and Harris, 2007). Da mesma forma, a superexpressão de Prx2 protegeu cultura de células neuronais contra danos oxidativos e isquêmicos (Boulos *et al.*, 2007).

1.3 Espécies reativas de oxigênio e neurotoxicidade

O sistema nervoso central é particularmente vulnerável ao ataque oxidativo. Apesar de constituir apenas 2% do peso corporal, o cérebro consome cerca de 20% de todo o oxigênio utilizado, e por consequência, maiores quantidades de ERO são formadas. Além disto, o cérebro é rico em ácidos graxos poliinsaturados que são alvos para radicais peroxil provocando reações em cadeia de peroxidação lipídica. Algumas regiões do cérebro também possuem uma grande concentração de ferro que pode catalizar a produção do radical $\bullet\text{OH}$ a partir do H_2O_2 produzido endogenamente. A concentração de enzimas antioxidantes como a GPx e a catalase também são menores no cérebro em comparação com outros órgãos como rim e fígado (Dringen, 2000; Halliwell; Gutteridge, 2007).

No cérebro, a concentração de GSH varia entre 1-3 mM, sendo maior em astrócitos do que em neurônios. Além do transporte de GSH, aminoácidos constituintes ou precursores da GSH, como a glutamina e a cisteína, também podem passar pela barreira hemato-encefálica, servindo como precursores para a síntese de GSH (Dringen, 2000). Apesar da atividade da GPx e GR serem muito menores no cérebro do que em órgãos como fígado e rim, essas enzimas desempenham um papel fundamental degradando o H_2O_2 produzido pelo intenso metabolismo neuronal, além da degradação de outros radicais lipídicos, interrompendo as cascatas de lipoperoxidação. Alterações nos níveis de glutatona também estão relacionadas com doenças neurodegenerativas. Na doença de Parkinson, por exemplo, foi visto uma diminuição nos

níveis de GSH na *substantia nigra pars compacta*, indicando a contribuição das ERO e dos danos oxidativos para essas doenças, e da GSH para a viabilidade neuronal (Dringen, 2000; Valko *et al.*, 2007).

O cérebro é um dos órgãos que mais consome energia, necessitando assim de uma grande produção de ATP. Diversas enzimas na cadeia transportadora de elétrons dependem de grupamentos Fe-S para realização das reações de oxiredução, e conseqüentemente a demanda de ferro por esse órgão também é aumentada. Nos oligodendrócitos a produção e manutenção de mielina também são dependentes de ferro, e essas células possuem uma concentração de ferro maior que outras células do cérebro. A síntese de diversos neurotransmissores também é dependente de enzimas contendo ferro, e problemas na regulação desse micronutriente pode levar a alterações na transmissão sináptica (Thompson; Shoham; Connor, 2001). Esta grande quantidade de ferro intracelular também propicia a formação de ERO através da reação de Harber-Weiss, tornando este tipo celular particularmente mais suscetível a estresse oxidativo.

1.4 Degradação de peróxidos por células neurais

Peróxidos são produzidos continuamente pelo metabolismo normal da célula. Apesar da concentração de peróxidos na célula dentro desse quadro fisiológico não ser tóxica, é necessário um controle rígido da manutenção dos níveis de H_2O_2 . Isso porque apesar do H_2O_2 ser um importante segundo mensageiro em vias de sinalização redox, a presença desta molécula permite a formação de $\bullet OH$ que reage rapidamente com qualquer molécula biológica. Quando há elevada produção de H_2O_2 a capacidade da célula em degradar peróxidos reflete a sua resistência a oxidantes, sendo crucial para a manutenção da homeostasia celular. Em situações onde se tem um aumento na produção de peróxidos, essa importância se torna ainda mais evidente, sendo que uma menor capacidade de degradação de peróxidos é refletida por uma maior vulnerabilidade celular (Baud *et al.*, 2004; Liddell *et al.*, 2006; Mitozo *et al.*, 2011).

A degradação de peróxido por células neuronais acontece por 3 vias principais, que são dependentes da atividade das enzimas catalase, GPx e Prx. No cérebro, a concentração de catalase é muito baixa, e isso combinado com sua baixa afinidade limita a atuação desta enzima. Da mesma maneira, como a catalase esta está presente apenas nos

peroxissomos, parece ter pouca importância na degradação de peróxidos produzidos endogenamente. Por outro lado, a inibição da catalase provoca uma diminuição da taxa de consumo de peróxidos em astrócitos e neurônios, aumentando a susceptibilidade das células a danos causados por H_2O_2 (Baud *et al.*, 2004; Dringen; Pawlowski; Hirrlinger, 2005; Mitozo *et al.*, 2011). Isto mostra que mesmo em baixas concentrações, a catalase é importante na degradação de peróxidos exógenos em concentrações suprafisiológicas. Da mesma maneira, astrócitos $GPx1^{-/-}$ são menos eficientes em degradar H_2O_2 ou peróxido de cumeno (CHP), e isso se reflete em uma maior vulnerabilidade aos oxidantes (Liddell *et al.*, 2006, 2006). Trabalhos também mostram que quando a GPx está inibida, a catalase também perde sua atividade, indicando uma cooperatividade entre os sistemas de degradação de peróxidos (Baud *et al.*, 2004). Astrócitos são mais eficientes em degradar peróxidos e mais resistentes à oxidantes do que neurônios. Esta capacidade tem sido vinculada a uma maior concentração de GSH. Maiores níveis de GSH podem proporcionar maior eficiência da GPx, já que esta depende da GSH (Dringen *et al.*, 1999).

No caso das peroxiredoxinas, sua importância ainda não está bem estabelecida. Em um trabalho recente desenvolvido por nosso grupo, mostramos que a inibição do sistema de reciclagem da Prx, não diminui a taxa de degradação de peróxidos, nem aumenta a susceptibilidade de cultura de astrócitos ou neurônios ao H_2O_2 ou ao CHP. Estes dados indicam que este sistema tem uma importância menor que os outros em degradar peróxidos exógenos (Mitozo *et al.*, 2011). Outros trabalhos feitos com mitocôndrias isoladas de neurônios, porém, já salientam a importância deste sistema para a degradação de H_2O_2 gerado na mitocôndria (Drechsel; Patel, 2010; Kudin *et al.*, 2012), indicando que este sistema é importante na degradação de H_2O_2 endógenos.

Assim, os dados apresentados indicam que existe uma cooperatividade entre os 3 sistemas que metabolizam peróxidos em proteger as células neurais contra danos oxidativos. Porém, parecem existir funções distintas para cada um dos sistemas, dependendo da natureza, concentração e origem do peróxido. De qualquer forma, há alguma sobreposição de função entre os sistemas que metabolizam peróxidos.

1.5. Zinco

Zinco (Zn) é um metal essencial para a estrutura de diversas enzimas. Nos mamíferos, zinco é o metal de transição mais abundante depois do ferro e participa em diversas funções fisiológicas e patológicas (Frederickson; Koh; Bush, 2005). A maior parte do Zn intracelular se encontra ligada a proteínas sendo que aproximadamente 30 a 40% do Zn intracelular se encontra no núcleo, 50% no citosol e o restante associados a membrana (Beyersmann; Haase, 2001). Existem mais de 300 enzimas descritas as quais possuem Zn em sua estrutura, onde este pode ter um papel catalítico. São exemplos de catálise pelo zinco coordenado a proteínas a atividade da anidrase carbônica, enquanto pode ter um papel somente estrutural, como no caso da Cu/Zn-SOD ou em motivos protéicos chamados "dedos de zinco", os quais estão envolvidos na interação proteína-DNA (Choi; Koh, 1998; Miller; McLachlan; Klug, 1985). O Zn, tanto em sua forma iônica (Zn^{2+}) como complexado com proteínas, está envolvido em diversos processos celulares, sendo parte constitutiva de diversas enzimas envolvidas na transdução de sinal e fatores de transcrição, modulando a atividade de proteínas cinases e fosfatases, etc. A grande importância do zinco também pode ser constatada pelo seu envolvimento em todas as etapas do ciclo celular de células de mamíferos, como crescimento, proliferação, diferenciação e morte celular (Beyersmann; Haase, 2001).

1.5.1. Zinco no sistema nervoso central

Nos mamíferos o cérebro concentra maior quantidade de Zn que outros tecidos, estimado em 100-150 μM (Takeda, 2000). Entretanto, concentração de zinco livre no citoplasma de culturas neuronais é muito baixa, apresentando-se na faixa de nanomolar (Weiss; Sensi; Koh, 2000). Em algumas regiões do cérebro, porém, existe um *pool* de Zn na sua forma iônica livre em vesículas sinápticas de neurônios denominados "gluzinérgicos", que podem conter até 300-350 μM Zn. Estes são neurônios glutamatérgicos que, durante a atividade neuronal, liberam Zn^{2+} juntamente com o glutamato na fenda sináptica (Fig 3) (Assaf; Chung, 1984; Paoletti *et al.*, 2009). Nesses neurônios, o Zn serve como um modulador neuronal, controlando a atividade sináptica. As funções fisiológicas do Zn ainda não são muito bem compreendidas,

mas evidências mostram que Zn pode modular a atividade de diversos receptores. Um desses efeitos é sobre o receptor glutamatérgico NMDA (NMDAr), o qual é inibido por Zn. O NMDAr está envolvido tanto em importantes processos fisiológicos como na plasticidade sináptica, quanto em diversos processos patológicos como epilepsia, isquemia-reperfusão e excitotoxicidade. Assim, uma regulação fina de sua atividade é de extrema importância para o funcionamento do NMDAr. Sendo assim, o Zn poderia servir como um anti-convulsivante natural, regulando a atividade desses receptores (Frederickson; Koh; Bush, 2005; Paoletti *et al.*, 2009). Por outro lado, a aplicação intra-hipocampal de Zn provoca ataques epiléticos em coelhos. Ratos mais resistentes à epilepsia também contém menos Zn sináptico, sugerindo que o excesso de Zn pode ser convulsivante (Flynn *et al.*, 2007; Paoletti *et al.*, 2009). Zn também pode modular a atividade de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA ou inibir receptores GABAérgicos, entre outros (Frederickson; Koh; Bush, 2005).

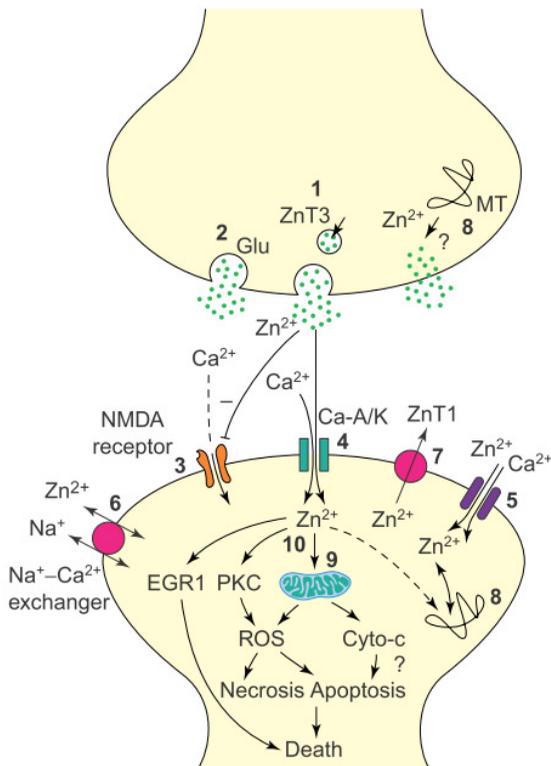


Figura 3. Transporte sináptico do zinco. O Zn se encontra em vesículas sinápticas (1) em neurônios glutamatérgicos aonde é liberado na fenda sináptica juntamente com o glutamato (2). Na fenda sináptica o Zn pode modular a atividade de receptores (3) e permear neurônios pós-sinápticos através de diversos canais iônicos e proteínas de transporte (3-7) promovendo eventos tóxicos como disfunção mitocondrial (9) e ativação de vias de sinalização (10). Outras proteínas como as metalotioneínas também podem liberar Zn, contribuindo para o aumento da concentração de Zn intracelular (8). Retirado de (Weiss; Sensi; Koh, 2000).

Na fisiologia normal do neurônio, o Zn liberado pela transmissão sináptica é rapidamente retirado. Entretanto, em situações patológicas como isquemia-reperfusão e neurodegeneração, ocorre uma superestimulação desses neurônios gluzinérgicos, o que pode culminar no acúmulo de Zn na fenda sináptica. Nestas condições pode haver a

translocação do Zn do neurônio pré-sináptico para o pós-sináptico, aonde Zn pode promover efeitos tóxicos (Choi; Koh, 1998; Frederickson; Koh; Bush, 2005). Além do Zn poder ser translocado, outros sítios também podem ser importantes para aumentar a sua disponibilidade no citoplasma. As metalotioneínas são proteínas que podem se ligar a metais, e são importantes na manutenção da homeostasia dos mesmos, entretanto, na presença de oxidantes, como o NO•, estas proteínas podem liberar Zn, além de promover reações pró-oxidantes, o que pode causar efeitos deletérios (Frederickson; Koh; Bush, 2005).

Por ser um metal sem atividade redox intrínseca, por muito tempo o Zn foi tratado como um metal não tóxico. Apesar do Zn ser essencial na fisiologia do SNC, diversos trabalhos mostram que, assim como o Ca²⁺, o Zn está envolvido na morte neuronal. A exposição de células a Zn promove uma série de efeitos deletérios tanto para neurônios quanto para glia, podendo induzir ubiquitinação dependente da ativação de proteínas cinases, tais como a MAPK p38 em neurônios hipocâmpais (Zhu *et al.*, 2012). Por vários mecanismos o Zn pode ativar NADPH oxidase tanto em neurônios quanto em astrócitos (Noh; Koh, 2000) aumentando a produção de ERO, induzir permeabilização da membrana de endossomos (Lee; Cho; Koh, 2009) e destruir a integridade mitocondrial (Gazaryan *et al.*, 2007; Medvedeva *et al.*, 2009). Além disso, níveis elevados de Zn foram encontrados em diversas doenças como isquemia-reperusão, traumatismo craniano e doença de Alzheimer, reforçando a hipótese do Zn como mediador de morte neuronal (Craddock *et al.*, 2012; Frederickson *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2000; McCranor *et al.*, 2011; Stork; Li, 2009)

Em vários modelos animais foi demonstrado que Zn pode inibir a GR *in vivo* (Franco *et al.*, 2006, 2008, 2009) ou *in vitro* (Bishop; Dringen; Robinson, 2007) e a TrxR (Bragadin *et al.*, 2004). Astrócitos expostos a concentrações elevadas de Zn (250 µM) perdem eficiência na degradação de peróxidos e acumulam mais GSSG quando expostas a H₂O₂ (Bishop; Dringeqwn; Robinson, 2007), demonstrando a modulação das defesas antioxidantes e o funcionamento celular.

Zn é mais tóxico a neurônios do que a astrócitos, sendo que doses que provocam grande morte neuronal não provocam toxicidade para astrócitos, mas a razão desta diferença ainda não foi elucidada (Dineley *et al.*, 2000).

2. JUSTIFICATIVA

O Zn já foi considerado um metal não tóxico, tendo em vista que não apresenta atividade redox. Trabalhos recentes, porém, tem demonstrado a participação desse metal em um crescente número de patologias no SNC como traumatismo craniano, isquemia/reperfusão, e até mesmo em doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer. De fato, trabalhos mais recentes relatam que muitos dos corantes que se utilizavam para detectar acréscimos de Ca^{2+} intracelular possuem mais afinidade pelo Zn do que pelo próprio Ca^{2+} . Desta forma, a participação do Zn como mediador de morte celular pode estar subestimada (Dineley *et al.*, 2000). Apesar disto, os mecanismos pelo qual Zn participa nestes processos promovendo a morte celular apenas estão começando a ser compreendidos. Assim, é necessário um entendimento mais completo sobre esses mecanismos, para que desta forma possa se buscar estratégias preventivas e/ou corretivas.

Neste sentido, a inibição das enzimas antioxidantes por Zn já foi demonstrada em diversos trabalhos, mas sua participação como um mecanismo de morte de células neurais ainda não foi muito explorada na literatura. Neste trabalho, investigamos o efeito do Zn sobre a modulação de importantes enzimas antioxidantes (GR e TrxR) em três modelos de células neurais [um modelo de astrócito (células C6), neurônio (células N2a) e tecido (fatias de hipocampo)], expostas a H_2O_2 e CHP. Desta forma, esse trabalho se propõe a analisar tanto os efeitos tóxicos do Zn *per se*, assim como possíveis respostas específicas dos diferentes modelos expostos ao Zn ou a oxidantes. Com isso, objetivamos verificar se a exposição dessas células a Zn promoveria uma maior vulnerabilidade desses modelos a danos oxidativos.

3. OBJETIVOS

Avaliar o efeito do Zn sobre a inibição de enzimas antioxidantes em diferentes modelos de células neurais e a consequente perturbação da viabilidade celular frente a um desafio oxidativo.

3.1 Objetivos específicos

1) Analisar possíveis diferenças na intensidade da inibição da GR e TrxR produzida pelo tratamento com Zn nos diferentes modelos: neurônio (neuroblastoma N2a de camundongos), astrócito (glioma C6 de rato) e tecido (fatias de hipocampo de ratos);

2) Verificar se a inibição das enzimas provocada pelo Zn altera a taxa de degradação de peróxidos (H_2O_2 e CHP) nos diferentes modelos;

3) Verificar se a exposição dos diferentes modelos neuronais ao Zn aumenta a susceptibilidade desses modelos ao dano causado pelos oxidantes H_2O_2 e CHP, através da análise de viabilidade celular pelo método do MTT, permeabilidade da membrana plasmática pelo método do iodeto de propídio e análise do dano ao DNA pelo teste do cometa.

4) Correlacionar todos esses dados com a toxicidade do Zn.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Para os experimentos foram utilizados ratos (*rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar* machos (60 a 90 dias), provenientes do Biotério Central da UFSC e mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas (luz das 7-19hs), com água e ração *ad libitum*. Os Princípios Éticos do COBEA foram seguidos para todos os experimentos, sendo o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA/UFSC).

4.2 Preparação das fatias de hipocampo

Para a obtenção das fatias, os ratos foram mortos por decapitação, e o hipocampo rapidamente dissecado sobre uma superfície gelada (4°C) e mantidas em solução HEPES-SALINA, contendo 124 mM de NaCl, 4 mM KCl; 1,2 mM MgSO₄; 25 mM de HEPES pH 7,4; 12 mM de glicose e 1mM CaCl₂, e oxigenado por 30 minutos antes da utilização. Com um fatiador de tecido *McIlwain*, foram feitos cortes transversais de 0,4 mm e as fatias foram então incubadas por 30 min à 37°C em meio fisiológico HEPES-SALINA, contendo para estabilização da preparação antes de iniciar o tratamento.

4.3 Cultura celular

Foram utilizadas linhagens de células de glioma de ratos C6 (*Rattus norvegicus*), variedade *Wistar*, e linhagens de neuroblastoma obtida de camundongos albinos N2a (*Mus musculus*) gentilmente cedidas pelo Laboratório de Farmacologia Experimental da UFSC (LAFEX). As células foram mantidas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* – Invitrogen Corporation, Auckland, New Zeland), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL, New York, USA) L-glutamina (2mM), glicose (4,5 g/L), bicarbonato de sódio (1,5 g/L), penicilina (0,5U/ml), estreptomicina (0,5 mg/ml) e incubada à 37°C e atmosfera umidificada em 95% contendo 5% CO₂. Para os experimentos de viabilidade celular e permeabilidade de membranas, as células C6 e N2a foram semeadas nas concentrações de 2x10⁵ células/mL em placas de 24 poços, no volume de 500 µL. Para os experimentos envolvendo inibição enzimática, as células foram semeadas na concentração de 10⁶ células/mL em garrafas, no volume de

5 mL, ambas com meio de cultura DMEM 24 horas antes dos procedimentos. Antes de iniciar os tratamentos com as células C6 e N2a, o meio de incubação DMEM foi substituído pelo meio hepes-salina, no qual foram realizados todos os procedimentos.

4.4 Tratamentos

Para verificar o efeito do Zn sobre as enzimas antioxidantes, as células ou fatias foram pré-incubadas com $100\mu\text{M}$ de ZnCl_2 por 30 min a 37°C . Esta concentração foi definida em estudos anteriores (Bahl, M., 2007). Após a pré-incubação, as células ou fatias foram lavadas, e $500\mu\text{L}$ de H_2O_2 ou CHP $100\mu\text{M}$ diluídos em HEPES-SALINA foi adicionado e incubadas por 1h. Para os experimentos de degradação de peróxidos, também foi realizado um grupo experimental na qual co-incubamos $100\mu\text{M}$ de ZnCl_2 com $0,1\mu\text{M}$ de auranofina, um inibidor específico da TrxR, com objetivo de verificar se a inibição do sistema das Prxs teria relevância para a degradação de peróxidos nas células tratadas com ZnCl_2 .

Em outro protocolo experimental, fatias de hipocampo foram incubadas com ZnCl_2 $100\mu\text{M}$ ou com um inibidor da enzima GR (BCNU $200\mu\text{M}$) por 30 min a 37°C . Após 30 min de incubação, as fatias foram lavadas e incubadas por 1h com H_2O_2 $0,3$ ou 1mM .

Para verificar se a inibição da enzima TrxR tinha sinergismo com a inibição da GR pelo ZnCl_2 , causando decréscimo na taxa de degradação de peróxidos, as células ou fatias de hipocampo foram incubadas com auranofina ($0,1\mu\text{M}$, por 60 min), conforme já utilizado anteriormente (Mitozo et al., 2011).

4.5 Análise da atividade de enzimas antioxidantes

Após as incubações, 12 fatias foram homogeneizadas com Heps 20mM , pH $7,0$ com a ajuda de um pistilo. O homogenato foi centrifugado por 30 min a 20000g , e o sobrenadante utilizado para a determinação da atividade. As células foram lisadas em hepes 20mM com 1% CHAPS e inibidores de proteases por 15 min em gelo, e centrifugadas por $16,000\text{g}$ por 8 min a 4°C . O sobrenadante foi coletado e utilizado para os ensaios.

4.5.1 Glutationa peroxidase

A atividade da GPx foi medida pelo método descrito em (Wendel, 1981). As amostras foram colocadas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0; 1 mM EDTA, GSH 1 mM, NADPH 0,225 mM e 0,2 U/ml de GR. A reação foi iniciada pela adição de peróxido de cumeno (1 mM). A enzima GPx presente na amostra degrada o CHP utilizando a GSH como doador de elétrons, resultando em Cumeno-OH, GSSG e água. O GSSG formado é então rapidamente reduzido pela GR adicionada ao meio reacional com o consumo de NADPH, que pode ser acompanhado espectrofotometricamente em 340 nm por 5 minutos. A atividade da GPx é proporcional ao consumo de NADPH.

4.5.2 Glutathione Redutase

A atividade da GR foi medida pelo método de (Carlberg; Mannervik, 1985). As amostras foram colocadas em meio reacional contendo tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0; 1 mM de EDTA e NADPH 0,225 mM. Ao adicionar 1 mM GSSG, a GR presente na amostra reduz essa molécula, consumindo NADPH no processo, que pode ser acompanhado em 340 nm por 5 minutos em espectrofotômetro.

4.5.3 Tioredoxina redutase

A Tioredoxina redutase (TrxR) foi medida pelo método descrito em (Arnér; Zhong; Holmgren, 1999). A amostra foi adicionada em tampão fosfato 100 mM pH 7,0; EDTA 10 mM, DTNB 5 mM e 0,2 mg/mL de BSA. As amostras foram então incubadas por 5 minutos até que todos os tióis da amostra reajam com o DTNB. Após esse tempo a reação foi iniciada com a adição de NADPH 200µM. A TrxR na amostra cataliza a quebra do DTNB à 2 TNB, que absorve luz em 412 nm.

4.6 Análise da viabilidade mitocondrial

A viabilidade mitocondrial foi medida através do método da redução do sal MTT (methylthiazolyldiphenil-tetrazolium) por mitocôndrias viáveis (Mosmann, 1983). Após o tratamento com Zn e os peróxidos, as células ou fatias foram incubadas com MTT 0,5 mg/ml em HEPES-SALINA por 30 min a 37°C. O formazan foi então solubilizado em 500 µL de DMSO e lido em 550 nm.

4.7 Permeabilidade da membrana

A integridade da membrana foi analisada por fluorescência usando o iodeto de propídio (IP). O IP é capaz de permear apenas células com membranas danificadas e se intercalam com o DNA. Após os tratamentos, as células ou fatias foram incubadas com 7 $\mu\text{mol/ml}$ por 30 min a 37°C. A fluorescência foi medida com λ_{exc} 535 nm e λ_{em} 617 nm.

4.8 Taxa de degradação de peróxidos

A concentração de peróxido no meio foi medida através do método PCA-FOX (Gay; Gebicki, 2002). Este método baseia-se na reação de peróxidos com íons de Fe^{2+} em meio ácido, formando Fe^{3+} que se complexa com o *xylene orange* (XO), formando cor que pode ser lida em 560 nm.

Para determinar a taxa de degradação pelas células, alíquotas do meio de incubação foram retiradas após 10, 30 e 60 minutos do início da incubação, e adicionadas no meio reacional contendo 110 mM PCA, 250 μM xylene orange e 250 μM FeSO_4 , e incubadas por 30 min a temperatura ambiente para determinar a quantidade de peróxido que ainda restava no meio. A absorbância das amostras foi comparada com uma curva padrão do peróxido correspondente (H_2O_2 ou CHP).

4.9 Análises estatísticas

Para verificar a inibição das enzimas e a taxa de degradação de peróxidos pelo tratamento com ZnCl_2 , um teste *t* foi realizado entre o grupo controle e o grupo incubado com Zn.

Para as análises dos parâmetros de viabilidade, integridade da membrana e danos no DNA, foi realizado uma ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.

A taxa de degradação de peróxidos foi calculada a partir dos dados obtidos nos tempos 30 e 60 minutos de incubação e comparado pelo teste *t* de student.

Todos os experimentos foram realizados no mínimo em triplicata, com ao menos duas culturas independentes. Cada valor amostral representa a média de 3 replicatas.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito da exposição ao $ZnCl_2$ sobre as defesas antioxidantes

Quando comparamos os valores basais das atividades das enzimas nesses diferentes modelos, encontramos algumas peculiaridades. A atividade da GR nas fatias de hipocampo ($71,3 \pm 12,3 \text{ nmol}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{min}$) e nas células N2a ($83,3 \pm 19,9 \text{ nmol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) são muito próximas, enquanto que a atividade desta enzima nas células C6 é cerca de 70% menor ($21,5 \pm 6,8 \text{ nmol/mg.min}$) (Fig. 4a). Em contrapartida, fatias de hipocampo ($7,2 \pm 2,3 \text{ nmol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) e células C6 ($4,6 \pm 2,2 \text{ nmol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) possuem uma atividade maior da TrxR quando comparada com células N2a ($2,7 \pm 1,6 \text{ nmol/mg.min}$) (Fig. 4b). A atividade da GPx é maior em fatias de hipocampo e células C6 do que nas células N2a (Fig. 4c). A atividade da catalase, por sua vez, é muito maior em células C6 do que nos outros modelos testados (Fig. 4d).

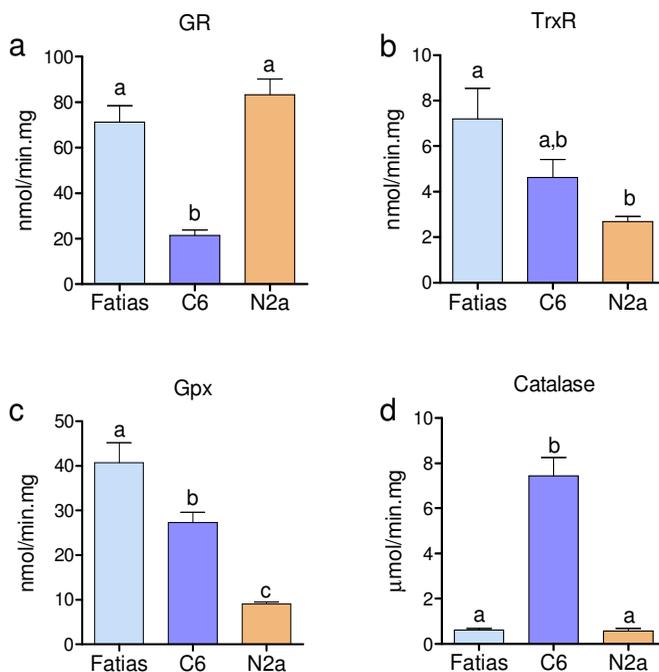


Figura 4. Comparação das defesas antioxidantes de diferentes células neurais. Após uma incubação de 30 min em tampão HEPES-SALINA, as células ou fatias foram lisadas, e a atividade da GR (a), TrxR (b), GPx (c) e CAT (d) foram analisadas em extrato bruto. Barras representam a média \pm erro padrão (n=3-7). Letras diferentes representam diferenças estatísticas pelo Teste t de Student para dados não pareados ao nível de significância de 0,05).

Células C6, N2a ou fatias de hipocampo foram incubadas por 30 min com 100 μ M de $ZnCl_2$, e a atividade das enzimas GR, GPx ou TrxR foram analisadas.

Como esperado, o tratamento com $ZnCl_2$ inibiu a atividade da GR nos três modelos. Nas fatias de hipocampo e células N2a o $ZnCl_2$ esta inibição equivale a cerca de 30% da atividade da GR. Nas células de astroglioma C6 este efeito foi bem maior, inibindo 77% da atividade da enzima (Fig. 5b). A atividade da TrxR não foi alterada nas fatias de hipocampo, assim como nas células N2a, no entanto, nas células C6, a

exposição do $ZnCl_2$ por 30 min foi capaz de inibir a atividade desta enzima em aproximadamente 40% (Fig 5e). $ZnCl_2$ não alterou a atividade da GPx em nenhum dos modelos testados.

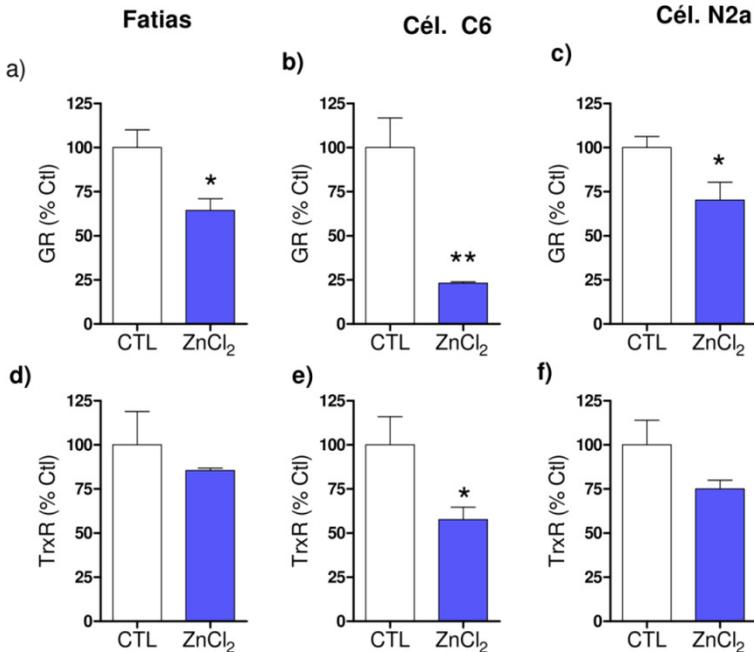


Figura 5 Inibição da GR e TrxR pela exposição ao $ZnCl_2$ sobre diferentes modelos de células neurais. Fatiás de hipocampo (a,d), células C6 (b,e) e N2a (c,f) foram incubadas com $100 \mu M$ $ZnCl_2$ por 30 min e a atividade da GR e TrxR foi testada. Valores representam a atividade expressa em porcentagem em relação ao grupo controle. Barras representam média \pm erro padrão (n=3-4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ representam diferenças estatísticas.

5.2 Efeito do tratamento com $ZnCl_2$ sobre a capacidade das células neurais de detoxificar peróxidos exógenos

A detoxificação de H_2O_2 ou de peróxidos orgânicos depende principalmente do sistema da GSH e da atividade da catalase (Dringen; Pawlowski; Hirrlinger, 2005; Liddell *et al.*, 2006; Mitozo *et al.*, 2011). Por outro lado, a participação do sistema Prx/Trx é pouco conhecido. Sendo assim, a inibição da GR impede a reciclagem eficiente da GSSG, que pode ter reflexo na eficiência na degradação de peróxidos pela célula, pois pode comprometer a reciclagem da GPx (Mitozo *et al.*, 2011).

Após o tratamento com 100 μM de $ZnCl_2$, foi adicionado 100 μM de H_2O_2 ou 100 μM CHP e a taxa de consumo do peróxido no meio de incubação foi determinada. Os diferentes tipos de células neurais e fatias de hipocampo degradaram os peróxidos em taxas diferentes. As fatias de hipocampo degradaram os peróxidos menos eficientemente que as duas linhagens de células, enquanto as células C6 foram ligeiramente mais rápidas na detoxificação de ambos os peróxidos. O consumo de H_2O_2 foi mais rápido que o consumo de CHP em todos os modelos (Fig. 6).

Tabela 1. Fração da taxa de consumo dos peróxidos após a inibição por $ZnCl_2$ (100 μM) ou $ZnCl_2$ na presença de um inibidor da TrxR (auronofina 0,1 μM).

	H_2O_2		CHP			
Fatias de hipocampo						
$ZnCl_2$	0,83 \pm	0,27 ^a	n=3	0,89 \pm	0,13	n=3
$ZnCl_2$ +Auronofina	0,94 \pm	0,1	n=3	0,87 \pm	0,04	n=3
Células C6						
$ZnCl_2$	0,76 \pm	0,11*	n=4	0,40 \pm	0,17**	n=4
$ZnCl_2$ +Auronofina	0,73 \pm	0,16*	n=4	0,44 \pm	0,11**	n=4
Células N2a						
$ZnCl_2$	0,70 \pm	0,18*	n=4	0,84 \pm	0,14	n=4
$ZnCl_2$ +Auronofina	0,75 \pm	0,21*	n=4	0,72 \pm	0,14*	n=4

^a Valores representam média \pm desvio padrão

O tratamento com $ZnCl_2$ não provocou qualquer efeito sobre o consumo de H_2O_2 ou CHP nas fatias de hipocampo (Fig. 6a). Nas células N2a somente o consumo de H_2O_2 foi reduzido em 30 % pelo tratamento com $ZnCl_2$ como mostrado na Fig. 6c. Em contrapartida, quando co-incubamos as células N2a foram co-incubadas com $ZnCl_2$ e auronofina, um inibidor da TrxR, observamos também uma diminuição de 28% da taxa de consumo de CHP. Nas células C6 tratadas com $ZnCl_2$, observamos um pequeno decréscimo na taxa de degradação de H_2O_2 (76 % do controle), enquanto o consumo de CHP foi acentuadamente reduzido (-60 %) nas células C6 quando tratadas com $ZnCl_2$ (Fig. 6B,E). Ao contrário das células N2a, o co-tratamento das células C6 com auronofina não aumentou o efeito do $ZnCl_2$ em reduzir a taxa de degradação de peróxidos (Fig. 6B,E).

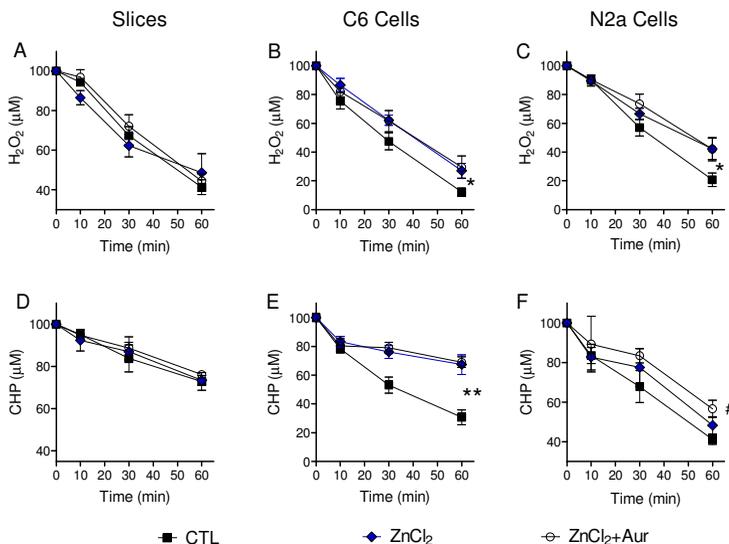


Figura 6. Taxa de degradação de peróxidos pelos três modelos neurais tratados com ZnCl₂. Após a incubação com ZnCl₂ (100 μM), as fatias de hipocampo (A e D), células C6 (B e E), e células N2a (C e F) foram lavadas e incubadas por 60 min com 100 μM de H₂O₂ ou 100 μM de CHP. Durante esse tempo, alíquotas do meio de incubação foram retiradas para medir a quantidade de peróxidos que restava no meio, como descrito em Materiais e Métodos. Os pontos da curva representam média ± erro padrão da concentração de peróxido (H₂O₂ ou CHP) presente no meio de incubação no tempo indicado (N = 3-4). Diferenças estatísticas nas taxas de degradação de peróxidos entre os grupos controle (CTL) e os grupos tratados com ZnCl₂ (* p < 0,05 ou ** p < 0,01) ou entre grupos controle e aqueles tratados com com a combinação de auronofina e ZnCl₂ (# p < 0,05) estão indicadas na figura.

5.3 Viabilidade celular

Diversos trabalhos mostram que a atividade das enzimas antioxidantes se correlacionam com uma maior resistência ou vulnerabilidade a oxidantes (Dringen; Pawlowski; Hirrlinger, 2005; Liddell *et al.*, 2006). Desta forma avaliamos a viabilidade celular nos

modelos neuronais expostos aos peróxidos, com ou sem o prévio tratamento com $ZnCl_2$.

O tratamento com $ZnCl_2$ *per se* não foi tóxico para fatias de hipocampo ou para as células C6, enquanto as células N2a apresentaram cerca de 45% de redução na viabilidade celular (Fig. 7c). Tanto nas células C6 quanto nas fatias de hipocampo, nenhum dos peróxidos provocou morte celular. Interessantemente, o H_2O_2 foi tóxico para as células N2a, enquanto o CHP não provou esse efeito (Fig. 7c).

A pré-exposição ao zinco potencializou o efeito tóxico tanto do H_2O_2 quanto do CHP em células C6, como nota-se pela queda de 37% na viabilidade (Fig. 7b). O pré-tratamento com $ZnCl_2$ foi ineficaz em reduzir a viabilidade celular em fatias de hipocampo tratadas com peróxidos (Fig. 7a). O tratamento com $ZnCl_2$ não tornou as células N2a mais vulneráveis à queda de viabilidade causada pelos peróxidos (Fig. 7c). Cabe destacar que tanto o $ZnCl_2$ quanto o H_2O_2 foram tóxicos *per se* em células N2a, diferentemente das células C6 que não tiveram suas viabilidades reduzidas pelo tratamento com $ZnCl_2$ ou peróxido, mas sim pela combinação de ambos.

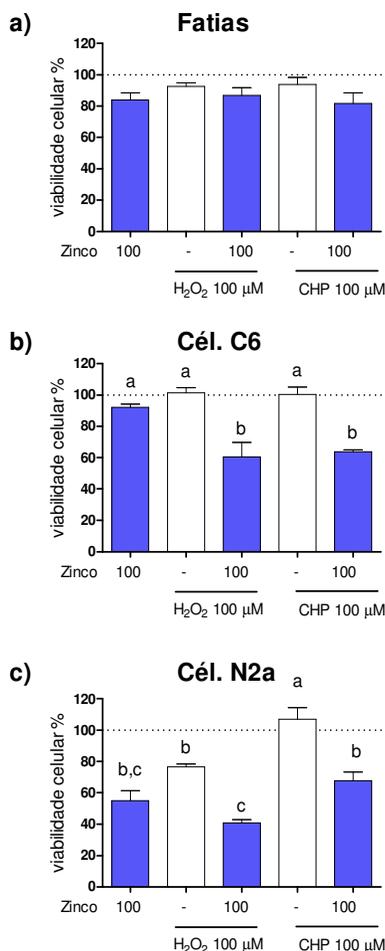


Figura 7. Efeito do $ZnCl_2$ na viabilidade celular de culturas neurais expostas a H_2O_2 ou CHP. Após a pré-incubação com $ZnCl_2$, as fatias de hipocampo (a), células C6 (b) e células N2a (c) foram expostas à 100 μM de H_2O_2 ou de CHP por 1h. Após esse tempo foi analisado a viabilidade celular através da redução do MTT, como descrito em Materiais e Métodos. Barras representam porcentagem em relação ao grupo controle (linha), e representam média \pm erro padrão ($n=2-4$). Letras diferentes representam diferenças estatísticas (Análise de variância de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey).

Como nenhum dos tratamentos causou qualquer efeito sobre a viabilidade das fatias de hipocampo, mesmo sendo eficiente em inibir a atividade da GR, pensamos que talvez algum efeito pudesse ser notado nas fatias quando essas fossem expostas a maiores concentrações de peróxidos. Dessa forma, após a incubação com 100 μM de ZnCl_2 , incubamos as fatias com 0,3 ou 1,0 mM de H_2O_2 por 1h. Concentrações de até 1 mM de H_2O_2 não foram tóxicas para as fatias de hipocampo nas nossas condições experimentais. O pré-tratamento com ZnCl_2 , porém, aumentou a vulnerabilidade das fatias quando expostas a 1 mM H_2O_2 . O mesmo foi observado quando as células foram pré-tratadas com 200 μM de BCNU, um inibidor clássico da GR (Fig. 8), cujos estudos anteriores indicam que este tratamento promove uma redução de aproximadamente 40% na atividade GR das fatias de hipocampo, similar ao efeito do tratamento com ZnCl_2 (Mitozo *et al.*, 2011).

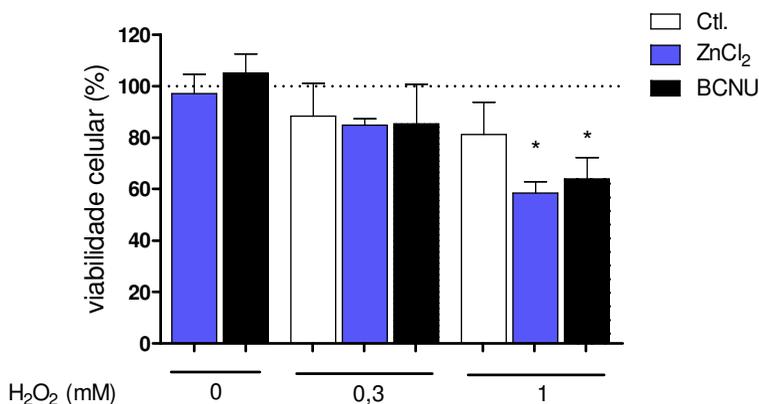


Figura 8. Efeito da inibição da GR na viabilidade fatias de hipocampo expostas a H₂O₂. Após uma pré-incubação com ZnCl₂ (100 μM) ou BCNU (200 μM), as fatias de hipocampo foram expostas por uma hora a 0,3 ou 1,0 mM de H₂O₂. Após esse tempo a viabilidade celular foi analisada através da redução do MTT, como descrito em Materiais e Métodos. Barras representam a porcentagem em relação ao grupo controle (linha), e apresentados como média ± erro padrão (n=3). * p < 0,05 representa diferença estatística em relação ao grupo controle (Análise de variância de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey).

5.4 Integridade da membrana

Após as incubações com peróxidos, também analisamos a integridade da membrana plasmática nos diferentes modelos estudados. Novamente, nenhum efeito foi identificado em fatias de hipocampo quando analisamos esse parâmetro (Fig. 9a). As células C6 tratadas com ZnCl₂, apresentaram um aumento na incorporação de IP quando expostas a CHP (Fig. 9b), concordando com os resultados da redução do MTT. Apesar de detectarmos grande perda de viabilidade celular pelo método do MTT, o ZnCl₂, peróxidos ou a combinação dos dois não provocou qualquer alteração na integridade da membrana das células N2a (Fig. 9c).

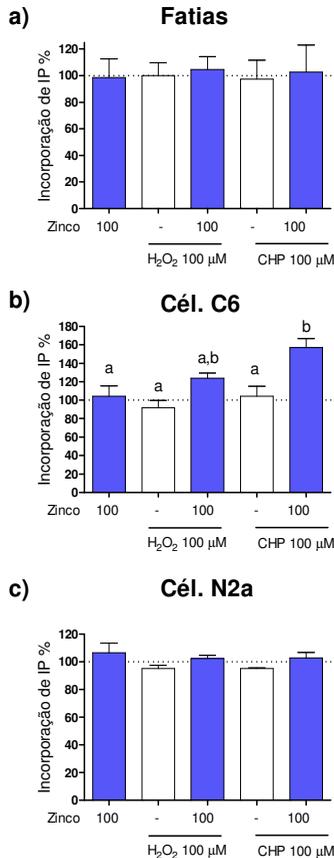


Figura 9. Efeito do ZnCl_2 sobre a integridade da membrana plasmática de culturas neurais expostas a H_2O_2 ou CHP. Após a pré-incubação com ZnCl_2 (100 μM), as fatias de hipocampo (a), células C6 (b) e células N2a (c) foram expostas à H_2O_2 ou CHP (100 μM) por 1h. Após esse período a incorporação de iodeto de propídio foi analisada, como descrito em Materiais e Métodos. Barras indicam a porcentagem em relação ao grupo controle (linha), e representam média \pm erro padrão ($n=3-4$). Letras diferentes representam diferenças estatísticas ao nível de $p < 0,05$ (Análise de variância de uma via seguida pelo testes *posthoc* de Tukey).

5.5 Danos no DNA

O tratamento com ZnCl_2 aumentou o índice de dano no DNA tanto nas células C6 quanto N2a. Tanto o H_2O_2 quanto o CHP provocaram um aumento significativo no índice de dano no DNA nas duas culturas celulares C6 e N2a (Fig. 10b,c). Em contrapartida, tanto o pré-tratamento com ZnCl_2 como a exposição aos peróxidos não aumentaram o dano no DNA nas fatias de hipocampo (Fig. 10a). O ZnCl_2 também promoveu um efeito sinérgico com os peróxidos, aumentando o índice de dano no DNA em células C6 (Fig. 10b), mas não em células N2a (Fig. 10c).

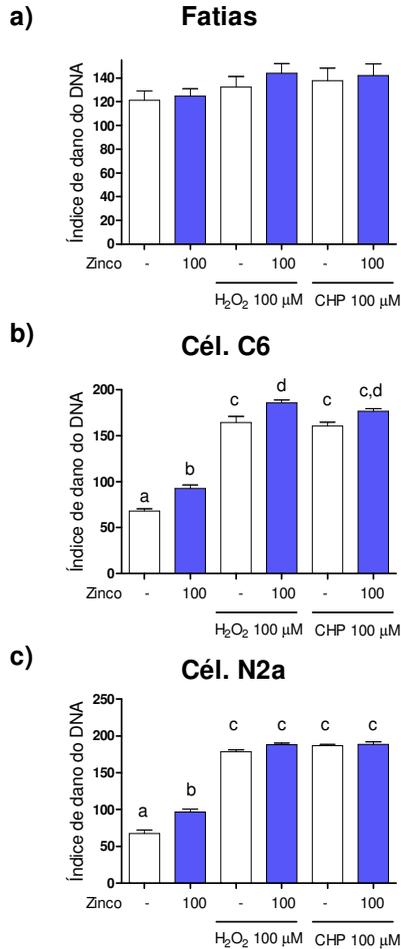


Figura 10. Danos no DNA de células neurais tratadas com ZnCl_2 e expostas a H_2O_2 ou CHP. Após a pré-incubação com ZnCl_2 (100 μM), as fatias de hipocampo (a), células C6 (b) e células N2a (c) foram expostas à H_2O_2 ou CHP (100 μM) por 1h. Após esse período, foi analisado o nível de dano no DNA pelo teste do cometa, como descrito em Materiais e Métodos. Barras indicam a porcentagem em relação ao grupo controle (linha), e representadas como média \pm erro padrão ($n=3-4$). Letras diferentes representam diferenças estatísticas $p < 0,05$ (Análise de variância de uma via seguida pelo testes *posthoc* de Tukey).

6. DISCUSSÃO

Zn é tóxico tanto para neurônios quanto para glia. Neurônios, porém, são muito mais vulneráveis aos efeitos tóxicos do Zn do que astrócitos (Dineley *et al.*, 2000). Neste trabalho, verificamos se este fato teria relação com o comprometimento dos sistemas antioxidantes causado pelo Zn. Também analisamos a vulnerabilidade de modelos de neurônios, astrócitos e fatias de hipocampo frente ao dano causado por peróxidos para verificar se a inibição desses sistemas, causada pela exposição ao Zn, poderia deixar as células mais vulneráveis.

6.1 Inibição das enzimas antioxidantes

Desde 1962 já se conhece a capacidade do Zn em inibir a enzima GR (Mize; Langdon, 1962). Desde então, diversos trabalhos mostraram que a exposição de diversas culturas celulares ao Zn resulta na inibição da GR, indicando que esta habilidade pode ter algum significado biológico importante (Bishop; Dringen; Robinson, 2007; Mitozo *et al.*, 2011; Wilhelm; Walther; Fichtl, 2001).

Neste trabalho, uma exposição de 30 min ao $ZnCl_2$ foi capaz de inibir a GR nos três modelos estudados, concordando com a literatura. A extensão dessa inibição, porém, foi diferente em cada um dos modelos. A incubação com Zn foi menos eficiente em inibir a GR nas células N2a do que nos outros modelos, enquanto nas células C6 essa inibição foi muito mais forte, reduzindo a atividade da enzima em mais de 70%. A atividade da GR nas fatias de hipocampo e células N2a se apresentou praticamente igual, enquanto as células C6 possuem uma atividade em torno de 70% menor. Desta forma, além de ter baixa atividade GR, as células C6 tiveram uma fração maior desta atividade eliminada pelo tratamento com Zn. Sendo assim, como as células C6 apresentam menor quantidade da enzima, a perda parcial de sua atividade produziria um efeito maior neste tipo celular. Em experimentos por nosso grupo pudemos constatar que 50% da enzima GR é inibida com uma concentração nominal de cerca de 7 μM de zinco (Franco *et al.*, 2008). Baseado nestes dados estima-se que em células C6 a concentração de Zn possa ter ultrapassado este valor e que nas células N2a este valor ainda não foi atingido.

Quando analisamos a atividade da TrxR, porém, notamos que apenas as células C6 tiveram essa enzima inibida pelo pré-tratamento

com Zn. No caso da TrxR, as células C6 apresentam cerca de 50% mais atividade desta enzima em comparação com as células N2a. Este fato demonstra que uma fração maior das enzimas antioxidantes das células C6 são afetadas do que os outros tipos celulares estudados quando expostas ao Zn.

A inibição do Zn sobre a GR pode ser de forma direta, sem a necessidade de segundos mensageiros. Apesar dos mecanismos pelos quais o Zn inibe a enzima ainda não estarem bem elucidados, sabe-se que estes efeitos são influenciados pela presença dos substratos da GR (GSSG e NADPH) (Bishop; Dringen; Robinson, 2007). Desta forma, é provável que durante a catálise o NADPH reduza a ponte dissulfeto entre a Cys-45 e Cys-50 no sítio ativo da enzima, e neste momento o Zn pode ser complexado com os grupos sulfidrilas expostos na reação de troca tiol-dissulfeto (Bishop; Dringen; Robinson, 2007). Concordando com essa noção, a pré-incubação da GR com GSSG, que formaria a ponte dissulfeto no sítio catalítico, protege a enzima contra a inibição por Zn (Mize; Langdon, 1962). Da mesma forma, trabalhos com a enzima purificada mostram que o Zn pode inibir a atividade da TrxR diretamente (Bragadin *et al.*, 2004).

Não podemos concluir por qual mecanismo o Zn está atuando para inibir as enzimas testadas, mas segundo evidências da literatura, é provável que em nossos modelos o Zn esteja agindo diretamente nas enzimas. Por outro lado, (Dineley *et al.*, 2000) mostra que o tratamento de até 300 μM de Zn não aumenta a fluorescência de Magfura-2 intracelular, um fluoróforo utilizado para a detecção de Zn, a não ser que fosse incubado juntamente com o ionóforo de Zn (piritiona). Nesse trabalho, porém, foi feita uma incubação aguda de 5 min. Em nosso modelo experimental incubamos as células por 30 min com Zn, então é possível que com uma exposição mais prolongada, o Zn possa permear as células. Ainda não foi bem esclarecido quais os sítios de entrada do Zn nas células, porém trabalhos mostram que Zn pode permear células neurais através do receptor glutamatérgico NMDA (Koh; Choi, 1994), canais de cálcio dependente de voltagem (Kim *et al.*, 2000), receptores de glutamato do tipo AMPA/kainato e através do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Sensi *et al.*, 1997).

6.2 Consumo de peróxidos

A degradação eficiente de peróxidos pela célula depende da manutenção do equilíbrio redox e da função das enzimas antioxidantes (Dringen; Pawlowski; Hirrlinger, 2005; Liddell *et al.*, 2006; Mitozo *et al.*, 2011). Neste trabalho, demonstramos que células C6, derivadas de astroglioma, são mais eficientes em degradar peróxidos que as células N2a, derivadas de neuroblastoma. Esses dados concordam com a literatura, que mostra que astrócitos possuem maior atividade na maquinaria necessária para degradar peróxidos. Por exemplo, astrócitos possuem mais glutatona e maior atividade específicas de catalase e GPx, ambas enzimas necessárias para a detoxificação de H_2O_2 (Dringen *et al.*, 1999; Hirrlinger *et al.*, 2002). Já como a concentração de GSH é maior em astrócitos, é esperado que essas células produzam mais GR para uma reciclagem eficiente da GSSG. Apesar disso, trabalhos mostram que astrócitos possuem uma atividade menor da GR, quando comparado a neurônios (Dringen; Pawlowski; Hirrlinger, 2005), concordando com nossos dados.

As fatias de hipocampo foram menos eficientes em degradar ambos os peróxidos do que as células C6 ou N2a. Esta menor eficiência, talvez esteja relacionada com a reduzida relação superfície/volume, uma vez que a fatia tem uma grande espessura, o que pode manter as células mais centrais isentas de interferências no meio de incubação. Em ambas as culturas as células ficam aderidas, sendo que o peróxido entra em contato diretamente com todas as células na placa. A fatia, porém, é um tecido que apresenta 0,4 mm de espessura, então é possível que a ação do peróxido fique restrita as células mais periféricas, não atingindo as camadas mais internas.

A inibição da GR nas células N2a foi acompanhada de um menor consumo de H_2O_2 , mas não de CHP. Em um trabalho publicado recentemente por nosso grupo, mostramos que a inibição de GR por BCNU em células N2a afeta tanto o consumo de H_2O_2 quanto de CHP (Mitozo *et al.*, 2011). Apesar do efeito do inibidor ser claro, nesse trabalho não foi analisado a extensão da inibição provocada pelo pré-tratamento de BCNU neste tipo celular, além de que o tratamento com BCNU depleta os níveis de GSH em fatias de hipocampo, o que pode reforçar o efeito da inibição da GR. Sendo assim, é possível que a inibição causada pelo Zn neste trabalho tenha sido menor do que aquela provocada por BCNU. Por outro lado, fatias de hipocampo tiveram uma inibição equivalente quando tratadas com BCNU 200 μM ou $ZnCl_2$ (Bahl, M., 2007). Ao encontro desta hipótese, a literatura (Bishop; Dringen; Robinson, 2007) mostra que astrócitos apresentaram o mesmo

nível de inibição por BCNU 200 μM quando tratados com Zn acima de 150 μM . Neste trabalho a concentração de Zn foi de apenas 100 μM .

Nas células C6, a inibição das enzimas antioxidantes limitou a degradação de CHP a 40% da taxa normal, enquanto que o consumo de H_2O_2 foi reduzido em torno de 25%. Este padrão também é alcançado quando células C6 são tratadas com 200 μM BCNU, na qual o consumo de CHP é muito reduzido, enquanto que o consumo de H_2O_2 foi menos afetado (Mitozo *et al.*, 2011). Nestas células, a atividade da GR foi extremamente comprometida pelo tratamento com Zn, concordando com a nossa hipótese inicial de que o comprometimento do sistema de regeneração de GSSG para GSH compromete a taxa de degradação de peróxidos. Nossos dados indicam, porém, que apesar da catalase ser encontrada em baixas concentrações em células neurais, ela tem um importante papel na detoxificação de H_2O_2 externo, já que a falta do sistema da glutatona afeta pouco a degradação deste peróxido. A literatura (Bishop; Dringen; Robinson, 2007) mostra que o tratamento de células astrocíticas com 100 μM Zn não afeta o consumo de H_2O_2 , discordando dos nossos dados, uma vez que a inibição da GR comprometeu a taxa de degradação de ambos os peróxidos. Entretanto, na presença de aminotriazol, um inibidor da catalase, essas células degradam este peróxido mais lentamente, indicando a importância da catalase. Em contrapartida o CHP não é metabolizado pela catalase, sendo ele apenas degradado pela GPx ou pela Prx. Ambos sistemas foram afetados pelo tratamento com Zn nas células C6, então sua capacidade em detoxificar CHP foi reduzida em ~60%. Anteriormente mostramos que a inibição do sistema da Prx pelo inibidor da TrxR auranofina não afeta o consumo de CHP por células C6, então apesar dos dois sistemas terem sido afetado em nosso modelo experimental, podemos inferir que a queda na taxa de detoxificação de CHP por esse tipo celular foi devido a inibição do sistema da GSH (Mitozo *et al.*, 2011), especialmente quando a inibição da GR está associada com a depleção de GSH.

A degradação de ambos os peróxidos pelas fatias de hipocampo não foram afetadas pelo Zn. Este resultado vai de encontro a outros trabalhos de nosso laboratório, nos quais a inibição da GR, em associação com a depleção de GSH por BCNU, leva a uma redução no consumo de H_2O_2 pelas fatias de hipocampo (Mitozo *et al.*, 2011).

6.3 Viabilidade celular

O pré-tratamento com Zn por si só diminuiu a redução do MTT somente em neuroblastoma N2a. Este dado vai ao encontro com trabalhos na literatura que mostram que neurônios são muito mais sensíveis à toxicidade do Zn que astrócitos (Bishop; Dringen; Robinson, 2007; Dineley *et al.*, 2000; Sheline; Behrens; Choi, 2000; Zhu *et al.*, 2012). Quando comparamos o nível de inibição provocado pelo tratamento com Zn em cada um dos modelos, notamos que as células C6, mesmo apresentando uma porcentagem de inibição muito maior das atividades das enzimas GR e TrxR, foram mais resistentes à toxicidade do Zn. Este dado indica que a maior toxicidade do Zn em neurônios não está relacionado com a inibição das enzimas antioxidantes. De fato, a inibição da GR ou da TrxR nem sempre são tóxicas por si só, apesar de deixar as células mais vulneráveis à danos oxidativos (Mitozo *et al.*, 2011). Concordando com isso, o acúmulo de GSSG na célula também nem sempre ocorre somente pela inibição da GR, sendo necessário um insulto pró-oxidante (Bishop; Dringen; Robinson, 2007).

O balanço GSH/GSSG é essencial para a manutenção da homeostasia e equilíbrio redox celular. Desta forma, o acúmulo de GSSG pode provocar efeitos deletérios e morte celular. Diversos trabalhos mostram que o tratamento de diversos tipos celulares com Zn não afeta o balanço de GSH/GSSG, a não ser em exposições prolongadas (Bishop; Dringen; Robinson, 2007; Chen; Liao, 2003; Wilhelm; Walther; Fichtl, 2001). Outros dados realizados em nosso laboratório também mostram que o tratamento de fatias de hipocampo com 100 μM de Zn não altera os níveis totais de GSH (Bahl, M., 2007). Desta forma, é improvável que em nosso modelo experimental, na qual as células passaram por uma exposição de apenas 30 min, o acúmulo de GSSG ou a diminuição dos níveis de GSH tenham contribuído para a queda na viabilidade encontrada nas células N2a. No entanto, a inibição da GR, quando a célula é exposta a H_2O_2 , potencializa a formação de GSSG, contribuindo para sua toxicidade (Bishop; Dringen; Robinson, 2007).

As células N2a também foram mais sensíveis aos danos causados por H_2O_2 do que outros modelos, como nota-se pela queda na viabilidade celular. Interessantemente, o H_2O_2 (100 μM) foi tóxico somente para essas células, indicando que o efeito tóxico deve atuar por vias diversas nas células C6 e fatias de hipocampo.

Com relação às células C6, o pré-tratamento com Zn aumentou a vulnerabilidade dessas culturas para ambos os tipos de peróxidos, sendo o modelo mais afetado pelo pré-tratamento com Zn quando exposto aos oxidantes. Nestas células, o consumo de CHP foi comprometido pelo tratamento com Zn, enquanto a taxa de degradação de H_2O_2 não foi afetada. A sensibilidade da célula ao H_2O_2 ou ao CHP foi a mesma, indicando que mesmo a catalase, compensando pela falta de GPx, consiga degradar rapidamente H_2O_2 , outros mecanismos estão envolvidos na morte celular, como por exemplo o acúmulo de GSSG.

Nenhum efeito tóxico do Zn ou peróxidos foi visto nas fatias de hipocampo. Entretanto, quando as fatias foram incubadas com concentrações mais altas de H_2O_2 , o Zn potencializou o efeito tóxico do peróxido quando em elevada concentração. Interessantemente, a queda na viabilidade promovida pelo Zn foi igual aquela promovida pela pré-incubação das fatias com BCNU, um inibidor clássico da GR, indicando que o efeito é provavelmente devido a queda na atividade enzimática e interferência no estado tiol/dissulfeto.

6.4 Permeabilidade da membrana

A exposição de CHP a células C6 tratadas com Zn provocou um aumento na permeabilidade da membrana, como indicado pela maior incorporação de IP. Este dado se correlaciona com a taxa de degradação de CHP, que foi significativamente menor nestas células quando comparado com o consumo de H_2O_2 , que não promoveu um aumento na permeabilidade.

Nas células N2a, apesar de encontrarmos uma grande redução da viabilidade pelo método do MTT, tanto pelo tratamento com Zn como pela exposição ao peróxido, não observamos nenhum aumento na permeabilidade da membrana. Essa discrepância, talvez possa ser explicada pelo princípio dos métodos utilizados. O método do MTT observa atividade metabólica através da redução do sal por mitocôndrias viáveis. É possível, então, que o efeito tóxico do Zn observado em nosso modelo experimental sobre estas células seja restrito a perda da função mitocondrial. De fato, Zn pode interferir em processos de produção de energia, como por exemplo inibindo a enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, envolvida na via glicolítica (Gazaryan *et al.*, 2007; Sheline; Behrens; Choi, 2000). Além disso, trabalhos também mostram que Zn pode romper o potencial de membrana mitocondrial,

concordando que a mitocôndria é um dos sítios vulneráveis a toxicidade do Zn (Dineley *et al.*, 2000; Medvedeva *et al.*, 2009). Com isso, é possível que as mitocôndrias das células N2a foram mais afetadas, o que se refletiria em um efeito maior na perda de viabilidade pelo método do MTT. Outra possibilidade que explicaria essa discrepância entre os métodos é a ocorrência de apoptose. Durante esse tipo de morte celular, a membrana permanece intacta até os estágios mais tardios. Então é possível que as células N2a estejam em um estágio inicial da apoptose, aonde a permeabilidade da membrana ainda não foi afetada, porém, não temos dados para suportar essa hipótese.

6.5 Dano no DNA

Como descrito anteriormente, o peróxido em excesso favorece a formação de $\bullet\text{OH}$ através da reação de fenton. A produção de $\bullet\text{OH}$ pode gerar danos a todas as estruturas celulares, dentre elas o DNA. Assim, analisamos os níveis de danos de DNA em nossos modelos após a incubação com os peróxidos, como um marcador de danos oxidativos.

Como esperado, os dois peróxidos aumentaram consideravelmente o índice de dano de DNA nas duas culturas de células. Nas fatias de hipocampo, porém, esse aumento não foi observado, corroborando com outros dados deste trabalho que mostram que as fatias de hipocampo são muito mais resistentes a toxicidade de ambos os peróxidos quando comparadas com as culturas de células. É importante ressaltar, porém, que o índice de dano basal das fatias foi cerca de duas vezes maior do que ambas as culturas. Talvez essa diferença esteja relacionada com a preparação das fatias, que pode provocar morte celular em várias etapas do processo. Então podemos sugerir que toda esta etapa preparatória acaba causando um estresse para as células, aumentando o dano basal ao DNA.

Tanto as células N2a quanto as células C6 apresentaram um pequeno aumento no índice de dano no DNA quando incubadas somente com Zn. Diversos trabalhos na literatura mostram que Zn pode aumentar a produção de ERO em neurônios e astrócitos, então é possível que estes ERO gerados pelo tratamento com Zn sejam responsáveis pelo maior dano observado em nosso modelo experimental (Bishop; Dringen; Robinson, 2007; Dineley *et al.*, 2000). Os dados de dano no DNA, porém, não se correlacionam totalmente com outros resultados obtidos. Apesar de células C6 e N2a apresentarem o mesmo incremento no índice de dano no DNA, as células N2a apresentaram morte neuronal,

enquanto as células C6 não. Desta forma era esperado que o dano nesta estrutura fosse maior nas células N2a.

Quando as células C6 foram expostas ao Zn, foi observado um efeito sinérgico do metal com H_2O_2 , confirmando os resultados anteriores que mostram que o tratamento com Zn diminuiu a velocidade de degradação do peróxido e aumentou a vulnerabilidade das células a danos oxidativos. O efeito do H_2O_2 ser mais proeminente do que do CHP neste parâmetro, porém, merece uma investigação mais aprofundada, já que a degradação deste peróxido foi mais comprometida do que a do H_2O_2 .

6.6. Considerações finais

Apesar da inibição da GR pelo Zn já ser conhecida há bastante tempo, pouca atenção tem sido dada a este efeito. A proposta desse trabalho foi explorar esse efeito, demonstrando que esta inibição pode provocar conseqüências biológicas. Entre os mecanismos de dano, que pode estar atuando juntamente com outros efeitos do Zn mais estudados, encontram-se a disfunção mitocondrial e modulação de vias de sinalização. Neste trabalho mostramos que o tratamento de células N2a e C6 com Zn diminuiu a velocidade com que esses degradam peróxidos. Apesar disso, o tratamento com Zn não alterou significativamente a resposta das células N2a aos peróxidos, indicando que a inibição da GR pelo Zn não deve ter grande participação na sua toxicidade nessas células. Interessantemente, as células C6 mais sensíveis a inibição das enzimas por Zn, apesar de serem mais resistentes à sua toxicidade. Além disso, os astrogliomas também foram mais vulneráveis a toxicidade de ambos os peróxidos do que neurônios e fatias quando expostos a Zn. Assim, é possível que apesar de que essas células possuam maior resistência ao Zn que neurônios, em situações patológicas onde a concentração de peróxidos no tecido está aumentada, astrócitos possam estar mais vulneráveis a essa situação.

7. CONCLUSÕES

a) O Zn possui efeitos diferentes sobre as enzimas antioxidantes de diferentes tipos celulares: em células N2a e fatias de hipocampo o tratamento com Zn inibiu somente 30-35 % da GR, enquanto nas células C6, além de uma grande inibição da GR (77%), também se observou a inibição da TrxR (30%).

b) A inibição das enzimas se refletiu em um menor consumo de H_2O_2 por células N2a e C6 e CHP por células C6. Quando co-incubamos $ZnCl_2$ mais auranofina, a taxa de consumo de CHP também foi reduzida nas células N2a, demonstrando a importância de ambos os sistemas na degradação de peróxidos.

c) As fatias de hipocampo tiveram a maior resistência à toxicidade do Zn e dos peróxidos do que os outros modelos. Quando as fatias são expostas a concentrações maiores de peróxidos, porém, observa-se um efeito sinérgico com Zn. Este efeito é dependente da inibição da GR, como confirmado pelo uso de um inibidor específico da GR (BCNU 200 μM).

d) As células N2a são mais suscetíveis a toxicidade de Zn, assim como H_2O_2 , quando comparado com os outros modelos estudados. O pré-tratamento com Zn, porém, não apresenta efeito sinérgico quando as células são expostas a H_2O_2 .

e) O tratamento com Zn deixou as células C6 mais vulnerável a ambos os peróxidos quando comparados aos outros modelos testados. Interessantemente, essas células foram mais resistentes do que as células N2a a toxicidade do $ZnCl_2$ ou peróxidos sozinhos.

f) Comparando os resultados com o N2a e C6, notamos que o Zn tem efeitos bem característicos em cada um dos modelos: enquanto nas células neuronais N2a o Zn deve estar agindo de uma maneira mais direta, como por exemplo ativando vias de sinalização ou aumentando a produção de ERO, nas células astrocíticas C6 o Zn apenas deixa as células mais vulneráveis a ataques oxidativos subsequentes através da inibição das enzimas antioxidantes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOV, A. Y.; SCORZIELLO, A.; DUCHEN, M. R. Three Distinct Mechanisms Generate Oxygen Free Radicals in Neurons and Contribute to Cell Death During Anoxia and Reoxygenation. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 5, p. 1129-1138, 31 jan. 2007.

ANDERSEN, J. K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? , **Published online: 01 July 2004; | doi:10.1038/nrn1434**, v. 10, p. S18-S25, 1 jul. 2004.

ARNÉR, E. S. J. Focus on mammalian thioredoxin reductases — Important selenoproteins with versatile functions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1790, n. 6, p. 495-526, jun. 2009.

ARNÉR, E. S.; ZHONG, L.; HOLMGREN, A. Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. **Methods in Enzymology**, v. 300, p. 226-239, 1999.

ASSAF, S. Y.; CHUNG, S. H. Release of endogenous Zn²⁺ from brain tissue during activity. **Nature**, v. 308, n. 5961, p. 734-736, 19 abr. 1984.

BAHL, M. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DO ZINCO E DA QUERCETINA EM MODELOS DE ISQUEMIA E ESTRESSE OXIDATIVO**. [S.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

BAUD, O. *et al.* Glutathione Peroxidase-Catalase Cooperativity Is Required for Resistance to Hydrogen Peroxide by Mature Rat

Oligodendrocytes. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 7, p. 1531 - 1540, Fevereiro. 2004.

BEYERSMANN, D.; HAASE, H. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. **BioMetals**, v. 14, n. 3, p. 331-341, 2001.

BISHOP, G. M.; DRINGEN, R.; ROBINSON, S. R. Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, n. 8, p. 1222-1230, 15 abr. 2007.

BOULOS, S. *et al.* Peroxiredoxin 2 overexpression protects cortical neuronal cultures from ischemic and oxidative injury but not glutamate excitotoxicity, whereas Cu/Zn superoxide dismutase 1 overexpression protects only against oxidative injury. **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, n. 14, p. 3089-3097, 1 nov. 2007.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. **The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen.** Disponível em: <<http://www.biochemj.org/bj/134/bj1340707.htm>>. Acesso em: 25 maio. 2012.

BRAGADIN, M. *et al.* Effect of Metal Complexes on Thioredoxin Reductase and the Regulation of Mitochondrial Permeability Conditions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1030, n. 1, p. 348-354, 1 dez. 2004.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 484-490, 1985.

CHEN, C.; LIAO, S. Zinc toxicity on neonatal cortical neurons: involvement of glutathione chelation. **Journal of Neurochemistry**, v. 85, n. 2, p. 443-453, 1 abr. 2003.

CHEN, L. *et al.* Lipid peroxidation up-regulates BACE1 expression in vivo: a possible early event of amyloidogenesis in Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 107, n. 1, p. 197-207, 1 out. 2008.

CHENG, W.-H. *et al.* Cellular Glutathione Peroxidase Knockout Mice Express Normal Levels of Selenium-Dependent Plasma and

Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidases in Various Tissues. **The Journal of Nutrition**, v. 127, n. 8, p. 1445-1450, 1 ago. 1997.

CHOI, D. W.; KOH, J. Y. ZINC AND BRAIN INJURY. **Annual Review of Neuroscience**, v. 21, n. 1, p. 347-375, 1998.

CHONG, Z. Z.; LI, F.; MAIESE, K. Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. **Progress in Neurobiology**, v. 75, n. 3, p. 207-246, fev. 2005.

CRADDOCK, T. J. A. *et al.* The Zinc Dyshomeostasis Hypothesis of Alzheimer's Disease. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e33552, 23 mar. 2012.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 813-824, 1 out. 2007.

DALLE-DONNE, I. *et al.* S-glutathionylation in protein redox regulation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 6, p. 883-898, 15 set. 2007.

DHAR, S. K.; ST. CLAIR, D. K. Manganese superoxide dismutase regulation and cancer. **Free Radical Biology and Medicine**, n. 0, 2012.

DINELEY, K. E. *et al.* Astrocytes Are More Resistant Than Neurons to the Cytotoxic Effects of Increased [Zn²⁺]. **Neurobiology of Disease**, v. 7, n. 4, p. 310-320, Agosto. 2000.

DOURADO, D. F. A. R.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. Mammalian cytosolic glutathione transferases. **Current Protein & Peptide Science**, v. 9, n. 4, p. 325-337, ago. 2008.

DRECHSEL, D. A.; PATEL, M. Respiration-Dependent H₂O₂ Removal in Brain Mitochondria Via the Thioredoxin/Peroxiredoxin System. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 36, p. 27850-27858, 3 set. 2010.

DRINGEN, R. *et al.* The Glutathione System of Peroxide Detoxification Is Less Efficient in Neurons than in Astroglial Cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 72, n. 6, p. 2523-2530, 1 jun. 1999.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in Neurobiology**, v. 62, n. 6, p. 649-671, 15 dez. 2000.

DRINGEN, R.; PAWLOWSKI, P. G.; HIRRLINGER, J. Peroxide detoxification by brain cells. **Journal of Neuroscience Research**, v. 79, n. 1-2, p. 157-165, 2005.

DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 1 jan. 2002.

FARINA, M. *et al.* Probucol Increases Glutathione Peroxidase-1 Activity and Displays Long-Lasting Protection Against Methylmercury Toxicity in Cerebellar Granule Cells. **Toxicological Sciences**, v. 112, n. 2, p. 416-426, 1 dez. 2009.

FLOHÉ AND HARRIS. **Peroxiredoxin Systems**. [S.l.] Springer, 2007. v. Vol. 44

FLYNN, C. *et al.* Zincergic innervation of the forebrain distinguishes epilepsy-prone from epilepsy-resistant rat strains. **Neuroscience**, v. 144, n. 4, p. 1409-1414, 23 fev. 2007.

FRANCO, J. *et al.* Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 3, p. 232-240, 15 mar. 2006.

FRANCO, J. L. *et al.* Biochemical alterations in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) exposed to zinc: glutathione reductase as a target. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 88-89, jun. 2008.

FRANCO, J. L. *et al.* Zinc reverses malathion-induced impairment in antioxidant defenses. **Toxicology Letters**, v. 187, n. 3, p. 137-143, 22 maio. 2009.

FREDERICKSON, C. J. *et al.* Concentrations of extracellular free zinc (pZn)_e in the central nervous system during simple anesthetization, ischemia and reperfusion. **Experimental Neurology**, v. 198, n. 2, p. 285-293, Abril. 2006.

FREDERICKSON, C. J.; KOH, J.-Y.; BUSH, A. I. The neurobiology of zinc in health and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 449-462, 13 maio. 2005.

GAY, C. A.; GEBICKI, J. M. Perchloric Acid Enhances Sensitivity and Reproducibility of the Ferric–Xylenol Orange Peroxide Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 304, n. 1, p. 42-46, Maio. 2002.

GAZARYAN, I. G. *et al.* Zinc Irreversibly Damages Major Enzymes of Energy Production and Antioxidant Defense Prior to Mitochondrial Permeability Transition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 33, p. 24373-24380, 17 ago. 2007.

HAAN, D. *et al.* 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. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 35, p. 22528-22536, 28 ago. 1998.

HALLIWELL, B. *et al.* The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601-617, jul. 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. [S.l.] Oxford University Press, USA, 2007.

HIRRLINGER, J. *et al.* Oligodendroglial cells in culture effectively dispose of exogenous hydrogen peroxide: comparison with cultured neurones, astroglial and microglial cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 82, n. 3, p. 635-644, 24 jul. 2002.

HOLMGREN, A.; LU, J. Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, n. 1, p. 120-124, 21 maio. 2010.

IMLAY, J. A. Pathways of Oxidative Damage. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 395-418, 2003.

JIN, M.-H. *et al.* Characterization of neural cell types expressing peroxiredoxins in mouse brain. **Neuroscience Letters**, v. 381, n. 3, p. 252-257, 24 jun. 2005.

KANG, S. W. *et al.* 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications. **Trends in Molecular Medicine**, v. 11, n. 12, p. 571-578, dez. 2005.

KIM, A. H. *et al.* L-type Ca²⁺ channel-mediated Zn²⁺ toxicity and modulation by ZnT-1 in PC12 cells. **Brain Research**, v. 886, n. 1–2, p. 99-107, 15 dez. 2000.

KOH, J.-Y.; CHOI, D. W. Zinc toxicity on cultured cortical neurons: Involvement of N-methyl-d-aspartate receptors. **Neuroscience**, v. 60, n. 4, p. 1049-1057, jun. 1994.

KUDIN, A. P. *et al.* The contribution of thioredoxin-2 reductase and glutathione peroxidase to H₂O₂ detoxification of rat brain mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, n. 0, 2012.

LEBOVITZ, R. M. *et al.* Neurodegeneration, Myocardial Injury, and Perinatal Death in Mitochondrial Superoxide Dismutase-Deficient Mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 18, p. 9782-9787, 3 set. 1996.

LEE, J.-Y. *et al.* Accumulation of Zinc in Degenerating Hippocampal Neurons of ZnT3-Null Mice After Seizures: Evidence Against Synaptic Vesicle Origin. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 11, p. RC79-RC79, 1 jun. 2000.

LEE, S.-J.; CHO, K. S.; KOH, J.-Y. Oxidative injury triggers autophagy in astrocytes: the role of endogenous zinc. **Glia**, v. 57, n. 12, p. 1351-1361, set. 2009.

LIDDELL, J. R. *et al.* Glutathione peroxidase 1 and glutathione are required to protect mouse astrocytes from iron-mediated hydrogen peroxide toxicity. **Journal of Neuroscience Research**, v. 84, n. 3, p. 578-586, 15 ago. 2006.

LIDDELL, J. R. *et al.* Glutathione peroxidase 1 and a high cellular glutathione concentration are essential for effective organic hydroperoxide detoxification in astrocytes. **Glia**, v. 54, n. 8, p. 873-879, 1 dez. 2006.

LOW, F. M. **The antioxidant activity of erythrocyte peroxiredoxin 2 and its role in protecting haemoglobin**. New Zealand: University of Otago, 2007.

MAHER, P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. **Ageing Research Reviews**, v. 4, n. 2, p. 288-314, maio. 2005.

MAULIK, N.; DAS, D. K. Emerging potential of thioredoxin and thioredoxin interacting proteins in various disease conditions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1780, n. 11, p. 1368-1382, nov. 2008.

MCCRANOR, B. *et al.* Quantitative imaging of mitochondrial and cytosolic free zinc levels in an in vitro model of ischemia/reperfusion. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, p. 1-11, 2011.

MEDVEDEVA, Y. V. *et al.* Intracellular Zn²⁺ accumulation contributes to synaptic failure, mitochondrial depolarization and cell death in an acute slice oxygen glucose deprivation (OGD) model of ischemia. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 4, p. 1105-1114, 28 jan. 2009.

MILLER, J.; MCLACHLAN, A. D.; KLUG, A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. **The EMBO Journal**, v. 4, n. 6, p. 1609-1614, jun. 1985.

MITOZO, P. A. *et al.* A study of the relative importance of the peroxiredoxin-, catalase-, and glutathione-dependent systems in neural peroxide metabolism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 1, p. 69-77, 1 jul. 2011.

MIZE, C. E.; LANGDON, R. G. Hepatic Glutathione Reductase I. PURIFICATION AND GENERAL KINETIC PROPERTIES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 237, n. 5, p. 1589-1595, 1 maio. 1962.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dezembro. 1983.

MUMBENGEGWI, D. R. *et al.* Evidence for a Superoxide Permeability Pathway in Endosomal Membranes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 11, p. 3700-3712, 1 jun. 2008.

NOH, K.-M.; KOH, J.-Y. Induction and Activation by Zinc of NADPH Oxidase in Cultured Cortical Neurons and Astrocytes. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 23, p. RC111-RC111, 1 dez. 2000.

PAOLETTI, P. *et al.* Zinc at glutamatergic synapses. **Neuroscience**, v. 158, n. 1, p. 126-136, 12 jan. 2009.

SENSI, S. L. *et al.* Measurement of Intracellular Free Zinc in Living Cortical Neurons: Routes of Entry. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 24, p. 9554-9564, 15 dez. 1997.

SHELINE, C. T.; BEHRENS, M. M.; CHOI, D. W. Zinc-Induced Cortical Neuronal Death: Contribution of Energy Failure Attributable to Loss of NAD⁺ and Inhibition of Glycolysis. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 9, p. 3139-3146, 1 maio. 2000.

SIES, H. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, n. 2, p. 291-295, 1 mar. 1997.

SOKOLOVA, T. *et al.* Catalase in astroglia-rich primary cultures from rat brain: immunocytochemical localization and inactivation during the disposal of hydrogen peroxide. **Neuroscience Letters**, v. 297, n. 2, p. 129-132, 12 jan. 2001.

STORK, C. J.; LI, Y. V. Rising zinc: a significant cause of ischemic neuronal death in the CA1 region of rat hippocampus. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 29, n. 8, p. 1399-1408, 3 jun. 2009.

TAKEDA, A. Movement of zinc and its functional significance in the brain. **Brain Research Reviews**, v. 34, n. 3, p. 137-148, dez. 2000.

THOMPSON, K. J.; SHOHAM, S.; CONNOR, J. R. Iron and neurodegenerative disorders. **Brain Research Bulletin**, v. 55, n. 2, p. 155-164, 15 maio. 2001.

URANGA, R. M.; GIUSTO, N. M.; SALVADOR, G. A. Iron-Induced Oxidative Injury Differentially Regulates PI3K/Akt/GSK3 β Pathway in Synaptic Endings from Adult and Aged Rats. **Toxicological Sciences**, v. 111, n. 2, p. 331-344, 1 out. 2009.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 1161-1208, 2005.

WEISS, J. H.; SENSI, S. L.; KOH, J. Y. Zn²⁺: a novel ionic mediator of neural injury in brain disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, n. 10, p. 395-401, 1 out. 2000.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325-333, 1981.

WILHELM, B. W.; WALTHER, U. W.; FICHTL, B. F. Effects of zinc chloride on glutathione and glutathione synthesis rates in various lung cell lines. **Archives of Toxicology**, v. 75, n. 7, p. 388-394, 2001.

WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 5, p. 549-561, 1 set. 2008.

WOO, H. A. *et al.* Reversible Oxidation of the Active Site Cysteine of Peroxiredoxins to Cysteine Sulfinic Acid IMMUNOBLOT DETECTION WITH ANTIBODIES SPECIFIC FOR THE HYPEROXIDIZED CYSTEINE-CONTAINING SEQUENCE. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 48, p. 47361-47364, 28 nov. 2003.

WOOD, Z. A. *et al.* Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 1, p. 32-40, jan. 2003.

YANT, L. J. *et al.* The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 4, p. 496-502, 15 fev. 2003.

ZHU, L. *et al.* Zinc neurotoxicity to hippocampal neurons in vitro induces ubiquitin conjugation that requires p38 activation. **Brain Research**, v. 1438, n. 0, p. 1-7, Fevereiro. 2012.