

Viviane de Souza

**EFEITO PROTETOR DE COMPOSTOS INÉDITOS
DERIVADOS DO PROBUCOL EM CÉLULAS HT22 NA
TOXICIDADE INDUZIDA PELO GLUTAMATO**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Mestre em
Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Farina

Florianópolis
2017

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

De Souza, Viviane

Efeito protetor de compostos inéditos derivados do probucol em células HT22 na toxicidade induzida pelo glutamato. / Viviane De Souza ; orientador, Marcelo Farina, 2017.

78 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

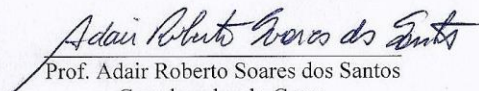
1. Neurociências. 2. Condições neurodegenerativas. 3. Estresse oxidativo. 4. Toxicidade oxidativa glutamatérgica. 5. Probuco. I. Farina, Marcelo . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

VIVIANE DE SOUZA

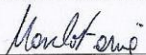
**“EFEITO PROTETOR DE COMPOSTOS INÉDITOS
DERIVADOS DO PROBUCOL EM CÉLULAS HT22 NA
TOXICIDADE INDUZIDA PELO GLUTAMATO”**

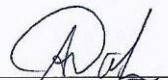
Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neurobiologia Celular e Molecular no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

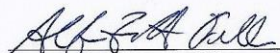
Florianópolis, 25 de abril de 2017.

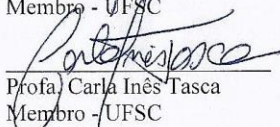

Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador do Curso

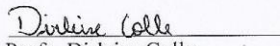
Banca Examinadora:


Prof. Marcelo Farina
Orientador – UFSC


Prof. Alcir Luiz Dafre
Membro - UFSC


Prof. Afeu Zanotto Filho
Membro externo ao Programa


Profa. Carla Inês Tasca
Membro - UFSC


Profa. Dirleise Colle
Membro - suplente

Dedico este trabalho aos meu pais,
meus irmãos, minhas cunhadas, minha
sobrinha e ao meu amor por todo o
suporte e paciência nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Pedro e Madalena por todo apoio, incentivo, carinho nos momentos difíceis e pelos puxões de orelha quando necessário. Vocês são o meu porto seguro, meu farol.

Agradeço aos meus irmãos, Ricardo e Geovani, e minhas cunhadas, Vanderléia e Priscyla, por todo o incentivo e apoio na decisão de realizar este mestrado. Vocês são meus exemplos, tenho muito orgulho de ser irmã de vocês, tanto de sangue quanto postiça.

Agradeço a minha sobrinha, Maria Fernanda, pela paciência quando a tia não podia ficar brincando com você. Meu coração enche de alegria quando você fala que me vê como modelo. Te amo minha eterna pequeninha da tia!

Ao meu namorado, Theo, por todo o carinho, paciência e por acreditar em mim. Você foi parte essencial para a realização deste trabalho. Obrigada por aturar as loucuras e crises da namorada. Mozi, te amo!

Ao meu orientador, Professor Marcelo, pela oportunidade de aprender dada a mim desde a iniciação científica. Agradeço por todas as discussões científicas e filosóficas e pela oportunidade de trabalhar junto ao seu grupo de pesquisa desde a minha iniciação científica. Agradeço por todos os ensinamentos e pelo apoio durante esses anos, nos quais sua orientação me proporcionou muito crescimento e aprendizagem.

Aos mais que colegas, amigos, de laboratório, Dirleise, Mark, Diones, Juliana, Heloisa, Cinara, Marina, Sthéfani, Letícia, Daniel e Marcos e Ana Cristina por toda o apoio, pelas conversas e discussões sobre ciência ou sobre a vida e pelas risadas. Me ensinam que quando se trabalha verdadeiramente em grupo, todos saem ganhando.

À Mariana pela paciência nos meus tempos de iniciação científica e por ter me ensinado grande parte do que sei sobre cultura de células. Aos colegas de laboratório que já foram procurar seus caminhos pelo mundo, Alessandra, Renata e Danúbia. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência e por todos os conselhos.

Aos colegas de corredor e do PPG em Neurociências, pelas conversas, cafés e troca científica essencial para minha formação.

Aos técnicos do LAMEB III, Bibiana, Vanessa, Camile, Denis pela disponibilidade e auxílio na utilização dos equipamentos.

Aos professores do PPG em Neurociências, responsáveis pela minha formação acadêmica e, posso dizer, para a vida também.

Ao apoio financeiro da CAPES e CNPq.

A todas as pessoas que colaboraram direta ou indiretamente na resolução deste trabalho.

“Não é sobre ter todas as pessoas do mundo pra si/
É sobre saber que em algum lugar alguém zela por ti/
É sobre cantar e poder escutar mais do que a própria voz/
É sobre dançar na chuva de vida que cai sobre nós/
É saber se sentir infinito/ Num universo tão vasto e bonito,
é saber sonhar/ E, então, fazer valer a pena/
Cada verso daquele poema sobre acreditar/
Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu/
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu/
É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações/
E assim ter amigos contigo em todas as situações
A gente não pode ter tudo/
Qual seria a graça do mundo se fosse assim?/
Por isso, eu prefiro sorrisos/
E os presentes que a vida trouxe pra perto de mim/
Não é sobre tudo que o seu dinheiro é capaz de comprar/
E sim sobre cada momento, sorriso a se compartilhar/
Também não é sobre correr contra o tempo pra ter sempre mais/
Porque quando menos se espera a vida já ficou pra trás/
Segura teu filho no colo/
Sorria e abraça seus pais enquanto estão aqui/
Que a vida é trem-bala, parceiro/
E a gente é só passageiro prestes a partir”
(Ana Vilela – Trem Bala)

RESUMO

A expectativa de vida da população vem aumentando gradualmente e o envelhecimento é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças ou condições neurodegenerativas. Embora existam tratamentos sintomáticos para tais condições, atualmente, não há fármacos efetivos que revertam a progressão da neurodegeneração. As condições neurodegenerativas possuem eventos patológicos em comum, tais como a neuroinflamação, o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial. No entanto, o completo entendimento dos mecanismos envolvidos no processo de neurodegeneração ainda não são totalmente elucidados. Neste contexto, diferentes estudos vêm sendo desenvolvidos para a compreensão de mecanismos relacionados à neurodegeneração, bem como para a busca de possíveis estratégias terapêuticas. O presente projeto objetivou investigar as possíveis ações protetoras de compostos inéditos derivados do probucol (RC 490 e RC 513), um fármaco antioxidante com atividade hipocolesterolemiantes, contra a toxicidade induzida por glutamato em cultivos de células neuronais da linhagem HT22, assim como elucidar possíveis mecanismos de ação destes compostos. Estudos comparativos com o composto-mãe (probutol) e com o disseleneto de difenila foram realizados. A exposição das células ao glutamato causou diminuição da viabilidade celular, depleção de glutathione e aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio. Os compostos inéditos demonstraram efeito neuroprotetor superior ao do probucol e disseleneto de difenila, prevenindo a diminuição da viabilidade celular e o aumento de espécies reativas de oxigênio induzidos pelo glutamato; porém, este efeito preventivo não ocorreu devido a manutenção dos níveis de glutathione. Os compostos inéditos também protegeram contra o dano oxidativo induzido pelo peróxido de *tert*-butila, porém, não apresentaram ação antioxidante direta sobre as espécies reativas (ação *scavenger*), com exceção do composto RC513. Os resultados apontam para os compostos inéditos derivados do probucol como promissoras moléculas na busca de estratégias terapêuticas para condições neurodegenerativas.

Palavras chaves: Condições neurodegenerativas. Estresse oxidativo. Toxicidade oxidativa glutamatérgica. Probutol.

ABSTRACT

Human life expectancy is gradually being increased and aging is an important risk factor for the development of neurodegenerative diseases. Although there are symptomatic treatments for such conditions, there are currently no effective drugs that reverse the progression of neurodegeneration. Neurodegenerative conditions have common pathological events, such as neuroinflammation, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction. However, the complete understanding of the mechanisms involved in neurodegeneration is not fully elucidated yet. In this context, different studies have been developed to understand the mechanisms related to neurodegeneration, as well as to search for possible therapeutic strategies. The present project aimed to investigate the possible protective actions of new compounds derived from probucol (RC 490 and RC 513), an antioxidant drug with hypocholesterolemic activity, against glutamate induced toxicity in HT22 cell cultures, a lineage of neuronal cells, as well as to elucidate possible mechanisms. Comparative studies with the parent compound (probuscol) and diphenyl diselenide were performed. Exposure of the cells to glutamate caused a decrease in cell viability, glutathione depletion and increased levels of reactive oxygen species. The novel compounds demonstrated a superior neuroprotective effect to that of probucol and diphenyl diselenide, preventing the decrease of cellular viability and increase of reactive oxygen species induced by glutamate; however, this preventive effect did not occur due to maintenance of glutathione levels. The novel compounds also protected against the oxidative damage induced by tert-butyl peroxide, but did not present direct antioxidant action on the reactive species (scavenger activity), except for compound RC513. The results point to the novel compounds derived from probucol as promising molecules in the search for therapeutic strategies for neurodegenerative conditions.

Keywords: Neurodegenerative disorders. Oxidative stress. Glutamate oxidative toxicity. Probuscol.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 3-NP – Ácido 3-nitropropiónico
 α S – α -sinucleína
 $A\beta$ – Peptídeo β -amilóide
AIF – Fator indutor de apoptose (do inglês *apoptosis-inducing factor*)
ANOVA – Análise de variância
APP – Proteína precursora amilóide
ARE – Elemento de resposta antioxidante
ASC – Área sob a curva
ATP – Adenosina trifosfato
AVE – Acidente vascular encefálico
cGMP – Monofosfato cíclico de guanosina
CHX – Cicloheximida
COX – Cicloxigenase
CTE – Cadeia transportadora de elétrons
DA – Doença de Alzheimer
DCF – 2, 7-diclorofluoresceína
DCFH-DA – 2, 7-diacetato diclorofluoresceína
DD – Disseleneto de difenila
DMEM – Do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)
DP – Doença de Parkinson
DPPH – 2, 2-difenil-1-picrilhidrazil
DTNB – Ácido 5, 5-ditio-bis-2-nitrobenzóico (do inglês *5, 5-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid*)
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
EPM – Erro padrão da média
EROs – Espécies reativas de oxigênio
EtOH – Etanol
FADH₂ - Dinucleotídeo de flavina e adenina reduzido (do inglês *flavin adenine dinucleotide*)
GCL – Glutamato-cisteína ligase
GSH – Glutathiona
GPX – Glutathiona peroxidase
GR – Glutathiona redutase
GSSG – Glutathiona oxidada
GST – Glutathiona-S-transferase
HBSS – Solução salina balanceada de Hank (do inglês *Hank's balanced salt solution*)
HO-1 – Hemeoxigenase -1

IC – Intervalo de confiança
IC₅₀ – Concentração que reduz a viabilidade celular em 50%
IFN- γ – Interferon γ
IL – Interleucina
IP – Iodeto de propídeo
Keap1 – Proteína associada ECH do tipo Kelch 1 (do inglês *Kelch-like ECH-associated protein 1*)
LOX – Lipoxigenase
MPTP – 1-metil-4-fenil-1, 2, 5, 6-tetrahidropiridina
MTT – Brometo 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)2, 5-difenil-tetrazolium
NADH - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*)
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NMDA – N-metil-D-aspartato
NMDAR – Receptor do tipo NMDA
NOX – NADPH-oxidases
NPSH – Tióis não proteicos (do inglês *non-protein sulfhydryl*)
Nrf2 - Fator nuclear relacionado ao fator eritróide 2 (do inglês *nuclear factor E2-related factor 2*)
PB – Probucof
PBS – Tampão salina fosfato (do inglês *phosphate buffered saline*)
Prx – Peroxirredoxina
SFB – Soro fetal bovino
SOD – Superóxido dismutase
tBuOOH – Peróxido de *tert*-butila
TCA – Ácido tricloroacético (do inglês *trichloroacetic acid*)
TNF- α – Fator de necrose tumoral (do inglês *tumor necrosis factor α*)

LISTA DE SÍMBOLOS

U – Unidade

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

NO – Óxido nítrico

ONOO^- - Peróxinitrito

HO^\cdot – Radical hidroxila

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático dos eventos da toxicidade oxidativa glutamatérgica em células HT22 (TAN et al., 2001).	33
Figura 2. Estrutura química do disseleneto de difenila, do probucol e dos compostos análogos testados.	36
Figura 3. Desenho experimental para avaliação da toxicidade dos compostos análogos ao probucol.....	46
Figura 4. Efeito do tratamento com DD, PB e seus derivados inéditos sobre a viabilidade de células HT22.	47
Figura 5. Efeito do tratamento com DD, PB e seus derivados inéditos sobre a morte celular de células HT22.....	48
Figura 6. Desenho experimental para avaliação do efeito citotóxico do glutamato.	49
Figura 7. Efeito citotóxico da exposição ao glutamato em células HT22 sobre a viabilidade celular e citotoxicidade.	50
Figura 8. Desenho experimental para avaliação do efeito temporal sobre a viabilidade celular e a citotoxicidade.	51
Figura 9. Efeito temporal da exposição ao glutamato em células HT22 sobre a viabilidade celular e citotoxicidade.	51
Figura 10. Desenho experimental para avaliação do efeito neuroprotetor dos compostos análogos ao probucol frente ao dano celular induzido pelo glutamato.	52
Figura 11. Efeito neuroprotetor dos compostos inéditos derivados do PB.	53
Figura 12. Efeito do tratamento com DD, PB e seus derivados inéditos sobre a geração de espécies reativas (ERs) de células HT22 expostas ao glutamato.	55
Figura 13. Efeito do tratamento com DD, PB e seus derivados inéditos sobre os níveis de NPSH de células HT22 expostas ao glutamato.	56
Figura 14. Desenho experimental para avaliação do efeito neuroprotetor dos compostos análogos ao probucol frente ao dano celular induzido pelo tBuOOH.....	58
Figura 15. Efeito do pré-tratamento com DD, PB e seus derivados inéditos sobre a viabilidade celular de células HT22 expostas ao tBuOOH.	58
Figura 16. Efeito antioxidante dos compostos PB, DD, RC490 e RC513.	59
Figura 17. Efeito do pré-tratamento com DD, PB e seus derivados inéditos sobre a fluorescência emitida pela oxidação da sonda DCFH-DA induzida pelo tratamento com tBuOOH.....	60

Figura 18. Desenho experimental para avaliação do efeito do CHX sob o efeito neuroprotetor dos compostos inéditos frente ao dano induzido pelo glutamato.....	61
Figura 19. (A) Efeito do co-tratamento de CHX com DD, PB e seus derivados inéditos sobre a viabilidade celular de células HT22. (B) Efeito do co-tratamento de CHX com DD, PB, RC490 e RC513 sobre a viabilidade celular de células HT22 frente ao dano induzido pelo glutamato.....	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
1.1	DOENÇAS OU CONDIÇÕES NEURODEGENERATIVAS .	24
1.2	ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMA ANTIOXIDANTE ...	28
1.2.1	Enzimas catalase e superóxido dismutase	29
1.2.2	Sistema Antioxidante Tioredoxina/peroxiredoxina	30
1.2.3	Glutathiona	30
1.3	TOXICIDADE OXIDATIVA GLUTAMATÉRGICA	31
1.4	PROBUCOL E COMPOSTOS DERIVADOS	34
2	JUSTIFICATIVA	38
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL.....	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1	CULTIVO CELULAR	42
4.2	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	42
4.3	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	42
4.4	DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS.....	43
4.5	DETERMINAÇÃO DE NÍVEIS DE TIÓIS NÃO PROTEICOS 44	
4.6	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO PERÓXIDO DE <i>TERC</i> -BUTILA... 44	
4.7	DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	44
4.8	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	45
4.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
5	RESULTADOS	46
5.1	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS COMPOSTOS ANÁLOGOS AO PROBUCOL.....	46

5.2	AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DO GLUTAMATO	48
5.3	COMPOSTOS ANÁLOGOS AO PROBUCOL POSSUEM EFEITO PROTETOR FRENTE A TOXICIDADE OXIDATIVA GLUTAMATÉRGICA.....	52
5.4	COMPOSTOS ANÁLOGOS AO PROBUCOL PREVINEM O AUMENTO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS INDUZIDO POR GLUTAMATO.....	54
5.5	OS EFEITOS PROTETORES DOS COMPOSTOS ANÁLOGOS AO PROBUCOL FRENTE A TOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA OXIDATIVA NÃO OCORREM DEVIDO À MANUTENÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA	56
5.6	COMPOSTOS INÉDITOS ANÁLOGOS AO PROBUCOL PROTEGEM DO DANO CELULAR INDUZIDO PELO PERÓXIDO DE <i>TERC</i> -BUTILA, PORÉM NÃO POSSUEM AÇÃO DIRETA SOBRE AS ESPÉCIE REATIVAS	57
5.7	EFEITO PROTETOR DOS COMPOSTOS INÉDITOS FRENTE AO TRATAMENTO COM CICLOHEXIMIDA E GLUTAMATO....	61
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÃO.....	70
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS OU CONDIÇÕES NEURODEGENERATIVAS

A expectativa de vida da população vem aumentando gradualmente e as Nações Unidas estimam que, em 2050, aproximadamente 2 bilhões de pessoas terão acima de 60 anos (UN, 2013). O envelhecimento é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças ou condições neurodegenerativas, como a doença de Parkinson (DP), a doença de Alzheimer (DA) e o acidente vascular encefálico (AVE) isquêmico. Embora existam tratamentos sintomáticos para estas doenças, atualmente não há fármacos efetivos na reversão ou parada da progressão da neurodegeneração.

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa crônica, principal causa de demência entre idosos e a quarta causa mais comum de morte no mundo ocidental (WHO, 2000). Os sintomas clínicos predominantes na DA são déficits cognitivos e mudanças comportamentais. Pacientes com DA tipicamente apresentam primeiramente dificuldades em lembrar eventos recentes. Com a progressão da doença, sintomas adicionais se tornam presentes, que podem incluir problemas na linguagem, confusão, mudanças de humor, perda de memória a longo prazo. Eventualmente, os pacientes com DA se tornam completamente dependentes da assistência de cuidadores.

O cérebro de pacientes com DA apresenta perda de neurônios e sinapses, o que resulta em atrofia cerebral, principalmente nos lobos temporal e parietal, bem como no córtex frontal. Achados microscópicos característicos da doença são placas amilóides (senis) e emaranhados neurofibrilares. As placas amilóides extracelulares são densas e compostas por agregados de peptídeo β -amilóide ($A\beta$), enquanto que os emaranhados neurofibrilares intracelulares são compostos de filamentos helicoidais pareados de proteína tau hiperfosforilada (HANE et al., 2017; WATTS e PRUSINER, 2017). A hipótese da cascata amilóide postula que a presença de $A\beta$, em forma de placa senil ou de oligômeros, resulta na falha da função sináptica e na neurodegeneração. O $A\beta$ é gerado pela clivagem endoproteolítica da proteína precursora amilóide (APP), uma proteína transmembrana. APP é clivada por duas diferentes proteases: a β -secretase e a γ -secretase. A β -secretase primariamente cliva a região extracelular justamembrana do APP, resultando em um fragmento chamado C99. A porção transmembrana do C99 é então clivada pela γ -secretase, um complexo multiproteico que inclui as preselinas, liberando o peptídeo $A\beta$ e o liberando para o espaço intersticial. A clivagem do C99

pela γ -secretase ocorre de maneira heterogênea e resulta na geração de peptídeos A β com comprimento variando entre 37-43 aminoácidos. O A β forma uma variedade de estruturas quaternárias incluindo as fibras amilóides e uma classe ampla de estruturas intermediárias chamadas de oligômeros amilóides. A agregação e subsequente deposição de peptídeo A β resulta em hiperfosforilação e polimerização da proteína tau em emaranhados neurofibrilares e, ultimamente, degeneração dos neurônios. Os vários mecanismos que levam a esta neurotoxicidade tem sido estudados, incluindo a neuroinflamação, estresse oxidativo e hiperexcitação do receptor NMDA (HANE et al., 2017). O depósito e agregação do A β está relacionado com a ativação de astrócitos e microglia, que produzem diversas moléculas pró-inflamatórias. Altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , estão presentes em cérebros de pacientes com DA. A relação entre neuroinflamação e A β ainda não está totalmente elucidada, uma hipótese sugere que A β pode atuar na regulação da cascata neuroinflamatória e outra que mediadores neuroinflamatórios regulam a expressão gênica e agregação deste peptídeo (NIRAJAN, 2013; FAN et al. 2016).

O metabolismo energético celular encontra-se prejudicado na DA. Em cérebros de pacientes com DA, analisados *postmortem*, observou-se uma redução da atividade do complexo IV da cadeia transportadora de elétrons (CTE) de 25-30%, dependendo da região estudada, o que correlacionou-se ao estresse oxidativo (MUTISYA et al., 1994). Na DA também ocorre alterações na homeostase de metais como ferro, cobre e zinco, presentes nas placas senis. O A β liga-se a estes metais, que possuem potencial redox e pode levar ao estresse oxidativo (GREENOUGH et al., 2013). O estresse oxidativo leva à disfunção mitocondrial e conseqüente morte celular. Ainda não está claro se o estresse oxidativo e as alterações mitocondriais são eventos que antecedem ou são conseqüência do processo neurodegenerativo da DA.

A excitotoxicidade mediada por receptores do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) também contribui para a patologia da DA. Evidências científicas demonstram que, na DA, déficits na captação de glutamato em astrócitos e neurônios leva ao aumento da concentração de glutamato na fenda sináptica, o que pode ativar a excitotoxicidade mediada por receptores NMDA (NMDAR) através do aumento das concentrações de Ca²⁺ intracelular. A ativação prolongada de NMDAR extrasinápticos aumenta o processamento da APP, levando a liberação do A β , contribuindo para o desenvolvimento de DA (BORDJI et al., 2010; BUTTERFIELD e POCERNICH, 2003).

A doença de Parkinson é outra doença neurodegenerativa, onde a maioria dos casos ocorre após os 60 anos. Os sintomas mais característicos no início da doença são relacionados ao sistema motor, incluindo tremor, rigidez, movimento vagaroso e dificuldade na execução da marcha. Na DP há especialmente dois achados importantes: a perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra do gânglio basal, uma região do mesencéfalo, e a agregação e dobramento aberrante da proteína α -sinucleína (α S), formando as inclusões chamadas de corpos de Lewy. Durante o processo de agregação, diversos fatores promovem o dobramento errôneo e transformação da α S em uma estrutura oligomérica rica em folhas β . Os oligômeros são reorganizados em fibras amilóides, o que forma os depósitos citoplasmáticos chamados de corpos de Lewy. A aceleração da agregação da α S é promovida por condições genéticas e ambientais, como exposição ocupacional a pesticidas, superexpressão de α S, mutação em genes que codificam para a proteína parkina (PARK2), entre outros (OBESO et al, 2008; GHIO et al., 2016). Danos à mitocôndria têm um importante papel na patologia da DP, sendo descoberto através da neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridina (MPTP), um subproduto da síntese de um análogo opióide, onde os indivíduos afetados possuíam sintomas similares ao parkinsonismo. Em uma reação catalisada pela enzima monoaminoxidase, o MPTP é convertido em um metabólito tóxico, o MPP⁺, o qual inibe o complexo I da cadeia respiratória. Além disso, diversos produtos de genes associados a mitocôndria têm sido relacionados à DP, como a parkina, que participa da destruição de mitocôndrias danificadas. Outra proteína mutada que mostra o papel do estresse oxidativo para o desenvolvimento e progressão da DP é a DJ-1, uma proteína relacionada ao início precoce do parkinsonismo quando mutada e que está envolvida na resposta ao estresse oxidativo. A proteína DJ-1 pode agir como um scavenger e também estabilizar o Nrf2 (fator nuclear relacionado ao fator eritróide 2). Outro fator envolvido na DP é a neuroinflamação, desencadeado pela perda de neurônios dopaminérgicos, facilitando a neurodegeneração de outros neurônios, com as células gliais, especialmente a microglia, adotando um fenótipo pró-inflamatório associado com liberação de moléculas citotóxicas (BUENDIA et al 2016; PRZEDBORSKI, 2017).

O acidente vascular encefálico pode afetar indivíduos de qualquer idade. No entanto, a incidência e prevalência desta condição aumenta com a idade (GOLDSTEIN et al, 2006). Estudos indicam que 75-89% dos AVEs ocorrem em pessoas com mais de 65 anos. A maior parte dos AVEs são causados por uma oclusão transiente ou permanente de vasos

sanguíneos encefálicos e são classificados como AVE isquêmicos (FEIGIN et al., 2003; MOZAFFARIAN et al., 2016). Os déficits neurológicos após um AVE isquêmico possuem uma alta variabilidade devido às causas, à duração, à localização e à severidade da isquemia, bem como devido à idade e demais comorbidades do indivíduo atingido. O AVE isquêmico geralmente é considerado um evento agudo que leva à neurodegeneração. Quando ocorre isquemia cerebral, a privação de glicose e oxigênio induz uma cascata patológica levando à redução da atividade da CTE e depleção dos níveis de adenosina trifosfato (ATP) e influxo de cálcio por canais de receptores glutamatérgicos, induzindo morte neuronal. Quando o fluxo sanguíneo é restaurado e ocorre a reoxigenação do tecido, os neurônios são expostos ao oxigênio resultando em dano oxidativo levando a morte celular. O nível do dano mitocondrial é fator determinante para a extensão do dano neuronal que pode ocorrer. O complexo I da CTE é particularmente sensível aos danos induzidos pelo AVE isquêmico e pela reperfusão. Ao mesmo tempo, a mitocôndria acumula Ca^{2+} , que pode ativar a abertura de poros de permeabilidade mitocondrial transitório, através do qual o citocromo c é liberado no citoplasma, resultando em ativação da caspase 3 e consequente morte celular. O déficit energético leva ao aumento da liberação do neurotransmissor excitatório glutamato e inibição da sua recaptação, resultando em excitotoxicidade. O acúmulo do glutamato na fenda sináptica ativa receptores ionotrópicos como o NMDA, levando ao aumento da concentração intracelular de cálcio, levando a disfunção mitocondrial e geração de espécies reativas. A ativação de vias de neuroinflamação podem contribuir para o dano neuronal secundário. A microglia ativada, após a isquemia, produz mediadores pró- e antiinflamatórios e o equilíbrio entre os dois determina o dano aos neurônios. A neuroinflamação induzida pelas células gliais leva a um aumento de estresse oxidativo e danos a barreira hematoencefálica (BUENDIA et al., 2016; CHAMORRO et al., 2016; RAEFSKY e MATTSON, 2017; ZHAO et al., 2017; DAWSON e DAWSON, 2017).

As condições neurodegenerativas possuem eventos patológicos em comum, tais como a neuroinflamação, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (SCHEPER e HOOZEMANS, 2015; FREEMAN e TING, 2016; BUENDIA et al., 2016; FEDERICO et al., 2012; ZHAO et al., 2017). No entanto, ainda não são totalmente compreendidos os mecanismos envolvidos no processo de neurodegeneração. Neste sentido, ao longo dos anos, diferentes modelos experimentais foram desenvolvidos para o estudo dessas doenças tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Dentre eles, podemos destacar aqueles que utilizam a modulação da

expressão de proteínas envolvidas na patogênese das doenças, toxinas, o aminoácido excitatório glutamato, privação de oxigênio e glicose e privação de suprimento sanguíneo (ALBIN e MILLER, 2016; REGLODI et al, 2011; SOMMER, 2017).

1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMA ANTIOXIDANTE

O estresse oxidativo está envolvido no desenvolvimento e progressão de condições neurodegenerativas, incluindo DP, DA e AVE isquêmico, bem como no processo de envelhecimento (NIEDZIELSKA et al, 2016; MANZANERO et al., 2013). O estresse oxidativo é uma condição caracterizada pelo excesso de agentes oxidantes em comparação com o sistema antioxidante protetor intrínseco de cada célula e pode ser desencadeado por processos exógenos (ex: xenobióticos, infecções virais e bacterianas, radiação ionizante, consumo de álcool e fumo) ou processos endógenos (Figura 1). Espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas em condições fisiológicas e removidas por sistemas antioxidantes, porém um aumento descontrolado dessas espécies leva ao aumento do risco de danos a moléculas biológicas (METODIEWA e KÓSKA, 2000; NIEDZIELSKA et al., 2016).

Espécies reativas de oxigênio são produzidas durante a respiração aeróbica, metabolismo celular e defesa contra patógenos (FALKOWSKI e GODFREY, 2008). A produção de EROs provindas da respiração aeróbica ocorre na membrana interna da mitocôndria, como consequência da CTE. A CTE consiste de uma série de complexos mitocondriais, como o complexo I (NADH-desidrogenase), complexo II (succinato-desidrogenase), complexo III (ubiquinona: citocromo c-oxirredutase), complexo IV (citocromo c oxidase) que transferem elétrons de NADH e FADH₂ para o oxigênio molecular. A energia liberada pela oxidação desses substratos é utilizada para gerar um gradiente de prótons através da membrana interna mitocondrial, que irá sintetizar ATP pelo complexo ATP sintase (MORÁN et al., 2012). Os complexos I e III são considerados os sítios primários onde ocorre a produção de ânion superóxido (O₂⁻), um radical livre relativamente estável, devido ao vazamento de elétrons da CTE. Há outras fontes de EROs intracelular sob condições fisiológicas, que podem ser estimuladas, como são as lipoxigenases (LOXs), ciclooxigenases (COXs) e NADPH-oxidases (NOXs) (BRENNAN et al., 2009; NAGLEY et al., 2010).

O ânion superóxido (O₂⁻) é considerado a espécie reativa de oxigênio primária, pois pode interagir com outras moléculas para gerar espécies reativas secundárias, diretamente ou através de reações

catalisadas por enzimas ou metais (Figura 1). O O_2^- formado é detoxificado a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela reação catalisada pelas enzimas superóxido dismutases, Cu/Zn-SOD e Mn-SOD, localizadas no espaço intermembrana e matriz mitocondrial, respectivamente. Esta reação ocorre em conjunto com enzimas que detoxificam H_2O_2 , como catalase e glutatona peroxidases e peroxiredoxinas (VALKO et al., 2006; MICHIELS et al., 1994; BENDIX et al., 2012). O ânion O_2^- também pode reagir com o óxido nítrico (NO), produzido a partir de L-arginina e L-citrulina em uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase, e formar o ânion peróxinitrito ($ONOO^-$), uma espécie reativa de nitrogênio altamente reativa (PACHER et al., 2007).

Estudos sugerem que, em situações de estresse, como excesso de O_2^- , ocorra a liberação de ferro na sua forma reduzida (Fe^{+2}) a partir de outras moléculas. O ferro livre pode participar da Reação de Fenton, bem como o cobre e outros metais, gerando o radical hidroxila ($HO\cdot$) (LIOCHEV e FRIDOVICH, 1994). Esta espécie reativa de oxigênio é altamente reativa, com meia vida bastante curta (aproximadamente 10^{-9} segundos); portanto, reage próximo ao seu local de formação (VALKO et al., 2007). O OH gerado pode oxidar várias moléculas, entre os alvos, estão os ácidos nucleicos, lípidos, proteínas e carboidratos, levando a morte celular (METODIEWA e KÓSKA, 2000).

Os sistemas que promovem a detoxificação das EROs e de xenobióticos eletrofílicos são as enzimas catalase, superóxido dismutases, sistema peroxiredoxina/tioredoxina e sistema glutatona (DRIGEN et al., 2005). Muitas destas enzimas e outras moléculas envolvidas na detoxificação e defesa antioxidante têm sua transcrição gênica regulada pela via Keap1 (proteína associada ECH do tipo Kelch 1)/Nrf2/ARE (elementos de resposta antioxidante). O Nrf2 está ligado ao Keap1 e este complexo está localizado no citoplasma. No entanto, em condições de estresse oxidativo, Nrf2 é dissociado do Keap1 e transloca para o núcleo, onde ativa a transcrição gênica mediada pelo ARE (ZHANG et al., 2013).

1.2.1 Enzimas catalase e superóxido dismutase

A família das enzimas superóxido dismutases são responsáveis por converter O_2^- em H_2O_2 e água. Células de mamíferos expressam três isoformas de SOD: SOD1, SOD2 e SOD3. SOD 1 e SOD 3 são conhecidas também como SOD dependente de cobre/zinco (Cu/Zn-SOD) estão localizadas no citosol, enquanto que a SOD2 ou SOD dependente de manganês (Mn-SOD) está localizada na mitocôndria. Em contraste

com a ampla expressão de SOD1 e SOD2 nos tecidos, SOD3 possui baixa expressão no cérebro. A conversão do H_2O_2 em água e oxigênio molecular é uma reação catalisada pela catalase, uma enzima antioxidante intracelular que está principalmente localizada nos peroxissomos. A catalase está amplamente expressa em neurônios e células gliais do sistema nervoso central (DAVIS e PENNYPACKER, 2016). Em um estudo com pacientes com DP, observou-se que as atividades catalase e SOD na corrente sanguínea estavam reduzidas em relação a indivíduos saudáveis com a mesma idade. Além disso, a atividade da catalase estava reduzida em pacientes com AVE isquêmico (DE LA TORRE, et al. 1996).

1.2.2 Sistema Antioxidante Tioredoxina/peroxiredoxina

A família das enzimas peroxiredoxinas (Prxs) é constituída de 6 isoformas (Prxs1-6) envolvidas na degradação enzimática de H_2O_2 , hidroperóxidos orgânicos e $ONOO^-$. Prxs estão localizadas no citosol; porém, algumas isoformas também podem estar localizadas na mitocôndria, peroxissomos, núcleo e membranas. Diferentes regiões cerebrais e tipos celulares apresentam diferentes perfis basais de expressão de Prx. Por exemplo, Prx1 e 6 são expressas em células gliais, enquanto que Prx2-5 estão localizadas nos neurônios. As Prxs possuem resíduos de cisteína no seu sítio ativo, o qual é sensível à oxidação pelo H_2O_2 . Quando o resíduo de cisteína do sítio ativo dessas enzimas está oxidado, ocorre inativação enzimática. Entretanto, esta inativação pode ser revertida pelo sistema tioredoxina redutase (TrxR), que usa NADPH como equivalente redutor para reduzir o resíduo de cisteína do sítio ativo. Quando as Prxs se encontram hiperoxidadas, as Trxs falham em restaurar a atividade de peroxidase. No entanto, esta hiperoxidação pode ser parcialmente reduzida ou reparada pela enzima sulfiredoxina (Srx) (BENDIX et al., 2012; VRIES et al., 2008; PARK et al., 2016).

1.2.3 Sistema Glutationa

A glutatona (GSH) é um tripeptídeo composto pelos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina; possui um papel importante no metabolismo celular como antioxidante, inclusive no sistema nervoso central, onde pode apresentar uma concentração de aproximadamente 2-3 mM. A GSH pode agir como *scavenger* de radicais livres, como O_2^- , NO, HO \cdot e $ONOO^-$. Além disso, pode atuar como doador de elétrons para a redução de H_2O_2 ou outros peróxidos catalisada pela enzima glutatona peroxidase (GPX). As moléculas de glutatona oxidada formam ligações

dissulfeto (GSSG) e podem ser reduzidas pela ação da enzima glutatona redutase (GR) com a utilização de NADPH. A relação entre a forma reduzida/oxidada é de aproximadamente 100 vezes em condições normais, mas reduz para a metade sob condições de estresse; esta razão serve como um indicador do estado redox celular. A GSH também pode reagir com diversos compostos endógenos ou xenobióticos em um evento mediado pela enzima glutatona-S-transferase (GST). A etapa limitante para a síntese de GSH é a reação catalisada pela enzima glutamato-cisteína ligase (GCL), onde glutamato e cisteína forma o dipeptídeo γ -glutamilcisteína, que reage com glicina através da reação catalisada pela GSH sintetase. A GSH regula a própria síntese através de retroalimentação negativa. A cisteína é o substrato limitante para a síntese neuronal de GSH. Em alguns tipos de células neurais, a cistina, forma oxidada com duas moléculas de cisteína unidas por uma ligação dissulfeto, é captada pela célula e, após redução, é utilizada como substrato para síntese de GSH. A cisteína pode ser internalizada, indiretamente, pela captação de cistina através do antiporte x_c^- cistina-glutamato (McBEAN et al, 2015; AOYAMA et al., 2008; DAVIS e PENNYPACKER, 2016).

1.3 TOXICIDADE OXIDATIVA GLUTAMATÉRGICA

O glutamato é um neurotransmissor excitatório presente na maior parte das sinapses do sistema nervoso central. A neurotransmissão glutamatérgica está envolvida no aprendizado e memória através do seu papel na plasticidade sináptica, além de estar envolvido em diversas desordens neurológicas e psiquiátricas, incluindo, AVE isquêmico, DA, DP, epilepsia, dor e esquizofrenia (BEART, 2016). Em determinadas condições neurodegenerativas, o glutamato atinge altas concentrações na fenda, causando morte neuronal (MATTSON, 2008). Esta neurotoxicidade ocorre principalmente através de duas vias: (i) uma envolve a ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, o que geralmente causa excitotoxicidade (KRITIS et al., 2015) e (ii) a outra ocorre através da indução de estresse oxidativo decorrente do bloqueio da captação de cistina (precursor de GSH) pela ação reversa do antiporter x_c^- cistina-glutamato (COYLE e PUTTFARCKEN, 1993; McBEAN et al., 2015).

O antiporter x_c^- cistina glutamato consiste de uma cadeia leve específica, SLC7A11 ou xCT, o qual confere especificidade, e uma cadeia pesada, 4F2hc ou CD98. As subunidades são ligadas por uma ponte dissulfeto (SATO et al, 2000). Este antiporter de aminoácidos

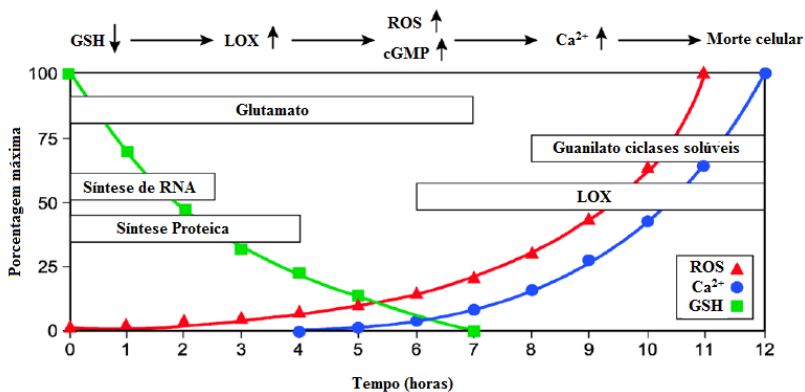
independente de sódio, medeia a captação do aminoácido não essencial contendo enxofre cistina em troca do aminoácido glutamato em uma razão de 1:1. A força que leva a esta captação de cisteína e o gradiente de alta concentração intracelular e baixa concentração extracelular de glutamato. A atividade do antiporter depende da presença de ânions cloreto e pode ser inibido pela concentração extracelular de glutamato. Após a captação de cistina, esta é rapidamente reduzida a cisteína, o qual é substrato limitante para a síntese de glutathiona (BANNAI, 1986; BANNAI e KITAMURA, 1980).

As células HT22, que representam uma linhagem de neurônios hipocámpais derivados de camundongos, quando em cultura, apresentam morfologia alongada bipolar ou multipolar. Esta linhagem não apresenta receptores glutamatérgicos do tipo ionotrópicos, tais como NMDA; portanto, a neurotoxicidade induzida pelo glutamato ocorre principalmente através da indução de estresse oxidativo (MAHER e DAVIS, 1996). Esta via de morte induzida pelo glutamato foi primeiramente denominada de toxicidade oxidativa glutamatérgica. No entanto, esta via também está associada com a morte de células neurais induzida por outros agentes e, por isto, pode ser denominada de forma mais abrangente como *oxitose* (TAN et al., 2001).

A toxicidade oxidativa glutamatérgica nesta linhagem pode ter como causa a incubação com altas concentrações de glutamato, o qual reverte a ação do antiporter x_c^- cistina-glutamato, levando à redução dos níveis intracelulares de cistina e resultando na redução da síntese de GSH. A depleção dos níveis de GSH ocorre de maneira tempo-dependente. A redução nos níveis de GSH leva a um aumento nos níveis de EROs com característica bifásica. Até as primeiras 6 horas após a exposição ao glutamato, há um aumento linear da produção de EROs em aproximadamente 10% do valor máximo, após 6 horas ocorre um aumento exponencial nos níveis de EROs, provavelmente devido a ativação de lipoxigenases (LOX). No SNC, 12-LOX predomina e possui sua atividade enzimática induzida pelos níveis baixos de GSH. Os seus produtos, ácidos 12- e 15- hidroxieicosatetraenóico (12- e 15-HETE), são potentes indutores de guanilato ciclases solúveis, o que aumenta o níveis de cGMP intracelulares. O aumento de cGMP abre canais de cálcio, levando à ativação de proteases e morte celular (Figura 2). A morte celular programada induzida pela toxicidade oxidativa do glutamato ocorre de maneira distinta da apoptose, necrose, e morte celular associada à autofagia; mas provavelmente seja sinônimo da morte celular não apoptótica e dependente de ferro denominada ferroptose (DIXON et al.,

2012; MURPHY et al., 1989; McBEAN et al., 2015; FUKUI et al., 2009; TAN et al., 2001; LI et al., 1997).

Figura 1. Diagrama esquemático dos eventos da toxicidade oxidativa glutamatérgica em células HT22 (TAN et al., 2001).



A linha indica o aumento ou redução relativa nas moléculas indicadas e os retângulos indicam o tempo após a adição de glutamato em que o processo indicado ocorre.

O estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial são eventos importantes que precedem a morte celular induzida pelo glutamato nas células HT22. A exposição ao glutamato altera o potencial de membrana mitocondrial, induz a liberação de citocromo c e do fator indutor de apoptose (AIF) mitocondrial para o citosol (FUKUI et al., 2009). Além disso, os níveis de ATP são reduzidos com a exposição ao glutamato sugerindo um dano mitocondrial (FUKUI e ZHU, 2010).

A linhagem celular HT22 tem se mostrado um bom modelo para estudar compostos com potencial neuroprotetor tendo como mecanismo a redução de estresse oxidativo. A astaxantina, um pigmento carotenóide, reduziu a produção de espécies reativas induzida pelo glutamato pela ativação ARE pela translocação Nrf-2 para o núcleo (WEN et al., 2015). Outro trabalho utilizando o α -isocubebenol, extraído da *Schisandra chinensis*, mostrou uma redução na concentração de cálcio intracelular, na despolarização da membrana mitocondrial e nos níveis de AIF, bem como, aumento da ativação do Nrf-2 e aumento na expressão da enzima hemeoxigenase-1 (HO-1) (PARK et al., 2015). Neste sentido, utilizamos o modelo das células HT22 expostas ao glutamato para avaliar o potencial neuroprotetor de compostos inéditos derivados do probucol.

1.4 PROBUCOL E COMPOSTOS DERIVADOS

O probucol (PB) é um composto fenólico que possui propriedades antiinflamatórias e antioxidantes (YAMASHITA e MATSUZAWA, 2009). O mesmo foi utilizado no tratamento da hipercolesterolemia familiar por muitas décadas; porém, devido aos seus efeitos adversos como o prolongamento da repolarização cardíaca e a redução dos níveis de HDL, a sua utilização foi abolida em muitos países, embora ainda ocorre em alguns países como Japão (TARDIF et al., 2002; McDOWELL et al., 1994; TARDIF et al., 2003).

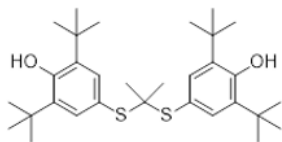
Este composto também apresenta propriedades neuroprotetoras como as demonstradas por trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa. O PB reduziu a produção de EROs e a peroxidação lipídica induzida em um modelo *in vitro* de Doença de Huntington baseado em fatias teciduais derivadas do estriado de ratos e na exposição ao ácido 3-nitropropiónico (3-NP) (COLLE et al., 2012). Em um modelo *in vivo* desta mesma doença, baseado na administração de 3-NP em ratos, pré-tratamento com PB apresentou efeito protetor e causou o aumento nos níveis de GSH e na atividade da enzima GPX (COLLE et al., 2013a). O tratamento com PB também preveniu danos cognitivos e sinápticos induzidos pela administração intracerebroventricular do peptídeo β -amilóide 1-40 em camundongos, em um modelo experimental de Doença de Alzheimer (SANTOS et al., 2012). Além disso, em um modelo *in vivo* de Doença de Parkinson (baseado na administração intracerebroventricular da toxina 6-hidroxidopamina), o tratamento com PB apresentou efeito protetor, reduzindo déficits comportamentais induzidos pela toxina, reduzindo a peroxidação lipídica e aumentando a atividade das enzimas GPX e GR (RIBEIRO et al., 2013).

Neste contexto, alguns grupos de pesquisa buscam o desenvolvimento de derivados do PB com uma maior biodisponibilidade e com menores efeitos adversos, tais como o succinobucol, um monosuccinil éster de probucol. De fato, o succinobucol possui também propriedades antiinflamatórias e antioxidantes similares ao probucol, porém sua utilização mantém como efeito adverso a redução nos níveis de HDL (KUNSCH et al., 2004). Um trabalho recente comparou o efeito protetor do PB e do succinobucol em um modelo *in vitro* de doença de Huntington, o qual mostrou que ambos os compostos preveniram o estresse oxidativo induzido pelo 3-NP, porém, o succinobucol apresentou maior eficiência em reduzir a disfunção mitocondrial induzida por este modelo (COLLE et al., 2013b). Além disso, o tratamento com

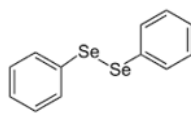
succinobucol reduziu a produção de espécies reativas e reverteu parcialmente o dano ao potencial de membrana mitocondrial induzidos pelo 3-NP em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y; tais efeitos foram correlacionados a um aumento nos níveis de GSH, bem como na expressão gênica e na atividade da enzima GCL, que é a enzima limitante da síntese de GSH (COLLE et al., 2016).

No intuito de pesquisar moléculas inéditas, as quais contenham as características antioxidantes e neuroprotetoras do probucol, porém com efeitos adversos reduzidos e aumento na biodisponibilidade, compostos derivados do probucol foram sintetizados e caracterizados quimicamente como parte do projeto de pós-doutorado do Dr. Rômulo Faria Santos Canto, sob coordenação do Prof Dr. Antonio Luiz Braga, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Estes compostos são obtidos a partir de mudanças estruturais que incluem, dentre outras, a troca do átomo de enxofre pelo do selênio, o qual é mais reativo que o enxofre. O selênio é parte integral e importante para a atividade biológica de selenoproteínas, incluindo GPx (ROTRUCK et al, 1973). Compostos contendo selênio estão sendo estudados e têm demonstrado propriedades antioxidantes, neuroprotetoras, ansiolíticas, antinociceptivas e antidepressoras (IBRAHIM et al, 2014; CHAGAS et al, 2014). Compostos orgânicos de selênio têm demonstrado efeitos menos tóxicos que aqueles compostos contendo selênio inorgânico. O disseleneto de difenila (DD) é um composto orgânico de selênio e tem propriedades antioxidante mimetizando a enzima GPx, reagindo com tióis para produzir sulfeto de seleninil, reagindo com glutatona reduzida e formando selenol. Por fim, o selenol reage com peróxido de hidrogênio para formar água e ácido selenico, o qual espontaneamente produz outra molécula de água e retorna a forma de DD (SILVESTRE et al, 2014; BARBOSA et al, 2006). Devido as características químicas similares, como o selênio orgânico e o perfil simétrico da molécula, o efeito neuroprotetor do disseleneto de difenila (DD) também foi investigado.

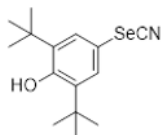
Figura 2. Estrutura química do disseleneto de difenila, do probucol e dos compostos análogos testados.



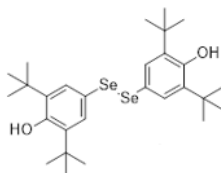
Probucol (PB)



Disseleneto de difenila (DD)



RC490



RC513

2 JUSTIFICATIVA

Com o aumento da expectativa de vida e, conseqüentemente, o envelhecimento populacional, há um aumento na incidência das condições neurodegenerativas relacionadas à idade. Desse modo, uma melhor compreensão acerca dos mecanismos envolvidos na patofisiologia destas doenças e a busca por novos alvos terapêuticos tornam-se necessárias. Diversos processos bioquímicos, principalmente aqueles relacionados à excessiva produção de espécies reativas, estão associados aos mecanismos de neurodegeneração envolvidos nas patologias neurodegenerativas. O estudo do eventual potencial neuroprotetor dos compostos derivados do probucol é de grande relevância tendo em vista os diversos trabalhos que mostram evidências de propriedades antioxidantes e antiinflamatórias do probucol em modelos de doenças neurodegenerativas. A toxicidade oxidativa glutamatérgica em células HT22 compartilha muitas características fisiológicas observadas em condições neurodegenerativas, como a depleção de GSH, sendo um bom modelo para screening de compostos para tratamento de condições neurodegenerativas. Desta forma, investigamos os mecanismos de ação do glutamato ao induzir oxitose sob as células HT22, utilizando marcadores de estresse oxidativo. Além disso, avaliamos também os eventuais efeitos protetores dos compostos derivados do probucol frente à oxitose induzida pelo glutamato, assim como possíveis mecanismos de proteção.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as possíveis ações protetoras de compostos inéditos derivados do probucol contra a toxicidade induzida por glutamato em cultivos de células da linhagem HT22, assim como elucidar possíveis mecanismos de ação destes compostos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Avaliar a citotoxicidade dos compostos derivados do probucol e do glutamato nas células HT22 através de ensaios de viabilidade e morte celular.
- ii. Verificar o efeito protetor dos compostos derivados do probucol sob a toxicidade oxidativa glutamatérgica através de ensaios de viabilidade celular e morte celular.
- iii. Verificar os efeitos da exposição ao glutamato e aos compostos derivados do probucol sob marcadores de estresse oxidativo, como a geração de espécies reativas e os níveis de tióis não proteicos.
- iv. Avaliar os efeitos dos compostos inéditos derivados do probucol no dano celular induzido pelo peróxido *tert*-butila na viabilidade e morte celular.
- v. Verificar a atividade antioxidante dos compostos inéditos análogos ao probucol.
- vi. Avaliar o efeito da inibição da síntese proteica na ação neuroprotetora dos compostos derivados do probucol através de ensaios de viabilidade e morte celular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTIVO CELULAR

Neste trabalho, utilizou-se a linhagem celular de neurônios hipocampais de camundongo HT22, uma sublinhagem das células HT4, originalmente imortalizadas de uma cultura primária de neurônios hipocampais de camundongo (FREDERIKSEN et al., 1988). As células foram desenvolvidas e gentilmente cedidas pelo Salk Institute for Biological Studies Califórnia, Estados Unidos da América. As células foram mantidas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As culturas foram mantidas em estufa de 5% de CO₂ a 37°C. Para a realização dos experimentos, utilizou-se as células entre a 4^a e a 13^a passagem.

4.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Para avaliar a viabilidade celular, foi realizado o ensaio da redução do brometo 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difenil-tetrazolium (MTT), sendo realizado como descrito por Mosmann (1983), o qual avalia a atividade lábil das desidrogenases mitocondriais através da redução deste composto a formazan, que possui cor violeta e pode ser mensurado espectrofotometricamente. Para este ensaio as células foram semeadas em placas de 96 poços com densidade de $9,0 \times 10^3$ células/ cm³. Após 24 horas em cultura, as células foram incubadas com 0,5 µM PB, DD, RC490, RC513 ou 0,05% de etanol (EtOH, utilizado como veículo para solubilização dos compostos). Em seguida, o meio foi substituído por DMEM suplementado com 3% de SFB e as células foram expostas ao glutamato. Após 1, 3, 6 ou 24 horas as células foram incubadas com MTT 0,5 mg/mL por 1,5 horas a 37°C. Após este período, a solução de MTT foi removida e 100 µL de DMSO puro foi adicionado para solubilização dos cristais de formazan. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro (Multileitora Infinite M200 TECAN) no comprimento de onda de 540 nm e os resultados foram expressos como porcentagem do controle (células não tratadas).

4.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

O ensaio de citotoxicidade foi realizado através da incorporação e ligação do iodeto de propídeo (IP) ao DNA, produzindo fluorescência

vermelha em células com a membrana plasmática danificada, sendo avaliada conforme o protocolo previamente descrito (PETEGNIEF et al., 2003). Para a realização deste ensaio, as células foram semeadas em placas de 96 poços e, após os mesmos tratamentos descritos no item 3.3 (ensaio de viabilidade celular), foram incubadas com IP a 147 µg/mL durante 30 minutos. Após a incubação, a fluorescência foi mensurada com excitação em 525 nm e emissão em 617 nm. Os dados foram expressos em porcentagem de fluorescência em relação as células tratadas com Triton 0,2% (100% morte).

4.4 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS

Para determinar a formação de espécies reativas, as células foram semeadas em placa de 12 poços com densidade de 9×10^3 células/cm³. Após 24 horas, as células foram tratadas com 0,5% de EtOH (veículo), 0,5 µM de PB, DD, RC490 ou RC513. Em seguida, o meio foi trocado por meio DMEM suplementado com 3% de SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e as células foram tratadas com 3 mM de glutamato. Após 6 horas de exposição ao glutamato, as células foram incubadas com 1 µM de 2',7'-diacetato diclorofluoresceína (DCFH-DA) durante 30 minutos a 37°C em ambiente com baixa luminosidade. A DCFH-DA, a qual é permeável à membrana celular, é deacetilada por esterases celulares em um composto não-fluorescente que, após, pode sofrer oxidação pelas espécies reativas em 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF). A DCF é um composto altamente fluorescente que pode ser detectado por espectroscopia de fluorescência com excitação de 488 nm e emissão de 525 nm. Após a incubação, as células aderentes à placa foram removidas pela adição de tripsina-EDTA na concentração de 0,05% (dissolvida em PBS) durante 3 minutos, em seguida sendo a enzima inativada com a adição de SFB 1% em solução salina balanceada de Hank (HBSS). A suspensão de células foi centrifugada a 1.200 x g por 3 minutos a temperatura ambiente e ressuspensas em HBSS; este processo foi repetido mais duas vezes e no final a intensidade de fluorescência na suspensão foi analisada através do citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, USA), registrando-se 10000 eventos por amostra. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle (células não-tratadas).

4.5 DETERMINAÇÃO DE NÍVEIS DE TIÓIS NÃO PROTEICOS

A determinação do conteúdo de tióis não proteicos (NPSH) foi realizada conforme método descrito por Ellman (ELLMAN, 1959), no qual o principal componente a ser mensurado é a glutatona reduzida (GSH). As células foram coletadas com Triton 0,5% em tampão salina fosfato (PBS), tendo em seguida suas proteínas precipitadas pela ação do ácido tricloroacético (TCA) 10% gelado e centrifugadas a $5.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi incubado com DTNB em tampão fosfato 1M pH 7,0. As absorvâncias foram mensuradas em 412 nm e uma curva de glutatona reduzida foi utilizada para calcular os níveis de NPSH. Os dados são expressos em nmol de NPSH/mg de proteína.

4.6 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO PERÓXIDO DE *TERC*-BUTILA

A susceptibilidade das células HT22 ao estresse oxidativo induzido por peróxido de *terc*-butila (tBuOOH) foi determinada utilizando a sonda DCFH-DA, a qual, conforme descrita anteriormente, é utilizada para a determinação da produção de espécies reativas. As células foram semeadas em placa de 96 poços com densidade de 9×10^3 células/cm³ e foram tratadas com 0,5 μM de PB, DD, RC490, RC513 ou EtOOH (0,05%, veículo) por 24 horas. Em seguida, foram incubadas com 1 μM de DCFH-DA durante 20 minutos a 37°C em ambiente com baixa luminosidade e, em seguida, foram tratadas com 10, 25, 50, 75 e 100 μM de tBuOOH, logo após, a fluorescência foi detectada por espectroscopia de fluorescência com excitação de 488 nm e emissão de 525 nm a cada 1 minuto durante 1 hora e trinta minutos. Os resultados foram expressos em área sob a curva (ASC).

4.7 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para avaliar a atividade antioxidante dos compostos foi utilizado o método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), através da reação destes com o radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) em uma solução de etanol. O DPPH que possui cor púrpura, é reduzido pela ação de um antioxidante ou de uma espécie radicalar formando difenil-picrilhidrazina, de coloração amarela, com consequente redução da absorvância. Os compostos foram testados na concentração final de 25 μM , bem como o controle positivo (Trolox). As soluções foram incubadas

com uma solução de DPPH 500 μ M por 30 minutos a temperatura ambiente e foi realizada a leitura em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 517 nm. A capacidade de redução do DPPH (% atividade antioxidante) foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Atividade Antioxidante (\%)} = \frac{(A^1 - A^2) \times 100}{A^1}$$

Em que:

A^1 = absorvância da solução de DPPH sem a amostra

A^2 = absorvância da amostra com DPPH

4.8 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

O conteúdo de proteína foi determinado de acordo com o método de Lowry e colaboradores (1951), usando albumina de soro bovino para construir a curva padrão.

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

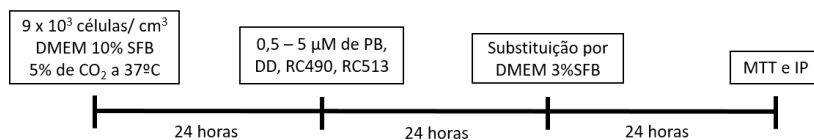
Os resultados obtidos foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey quando apropriado. Os dados foram representados como média \pm E.P.M e os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$. As análises estatísticas e os gráficos foram feitos utilizando o software Statistica 8.0. (StatSoft, Inc., 2008) e o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), respectivamente.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS COMPOSTOS ANÁLOGOS AO PROBUCOL

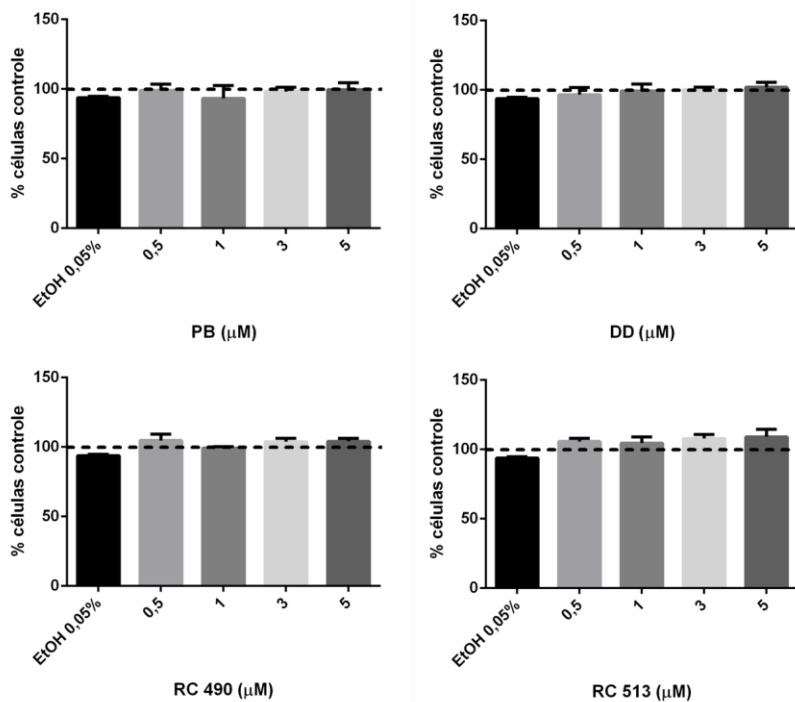
Após a exposição das células HT22 ao disseleneto de difenila, probucol e seus análogos, a viabilidade metabólica e morte celular foram avaliadas através do método de redução do MTT e incorporação de IP, respectivamente, conforme protocolo experimental demonstrado na Figura 4. Os resultados mostraram que, em todas as concentrações avaliadas, os compostos não causaram redução na viabilidade celular (Figura 5) e não foram citotóxicos (Figura 6). A partir desse resultado, a concentração de 0,5 μM foi definida para a realização dos próximos experimentos.

Figura 3. Desenho experimental para avaliação da toxicidade dos compostos análogos ao probucol.



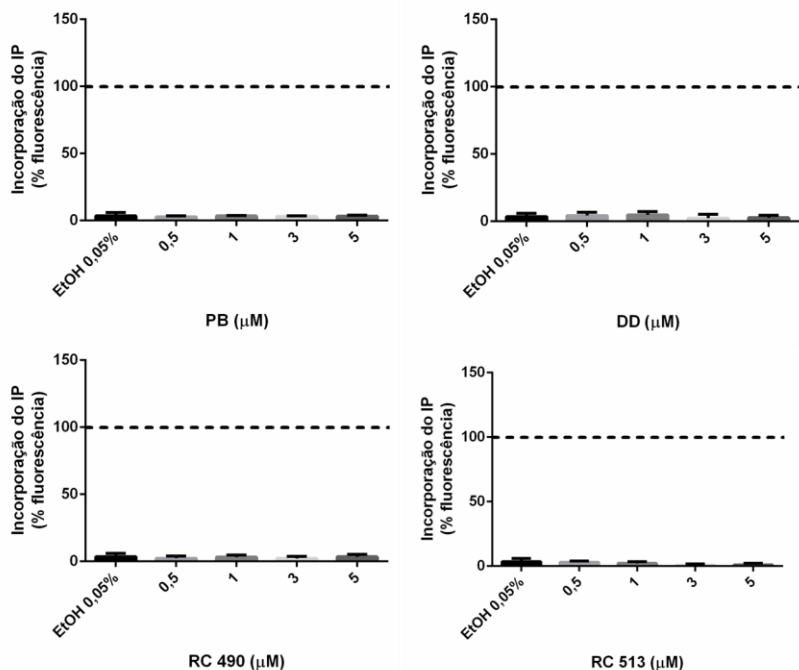
As células foram tratadas com os compostos em concentrações que variaram de 0,5 a 5 μM durante 24 horas em meio DMEM com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). Após 24 h, realizou-se a troca do meio (3% de SFB) e, após 24 h, a viabilidade celular foi avaliada através da medida da redução do MTT e citotoxicidade pelo ensaios de incorporação do IP.

Figura 4. Efeito do tratamento com DD, PB e seus derivados inéditos sobre a viabilidade de células HT22.



Resultados expressos como porcentagem do controle (células não tratadas, 100%). Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida do teste de post hoc Tukey).

Figura 5. Efeito do tratamento com DD, PB e seus derivados inéditos sobre a morte celular de células HT22.



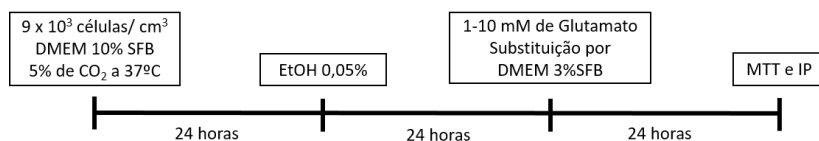
Resultados expressos como percentagem de células tratadas com Triton 0,2% (100% de morte). Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida do teste de post hoc Tukey).

5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DO GLUTAMATO

Para estabelecer a concentração de glutamato que reduz a viabilidade celular em 50% (IC_{50}), ensaios com uma curva de concentração de glutamato (1-10 mM) foram realizados e a viabilidade celular e citotoxicidade foram avaliadas conforme desenho experimental da Figura 7. A concentração de glutamato calculada (Figura 8) como sendo o IC_{50} foi de 3,242 mM (2,884 - 3,645 mM; IC 95%). Com a finalidade de facilitar a prática experimental, a concentração escolhida para a realização dos demais experimentos foi a de 3 mM. Para investigar os possíveis mecanismos envolvidos no efeito neuroprotetor dos

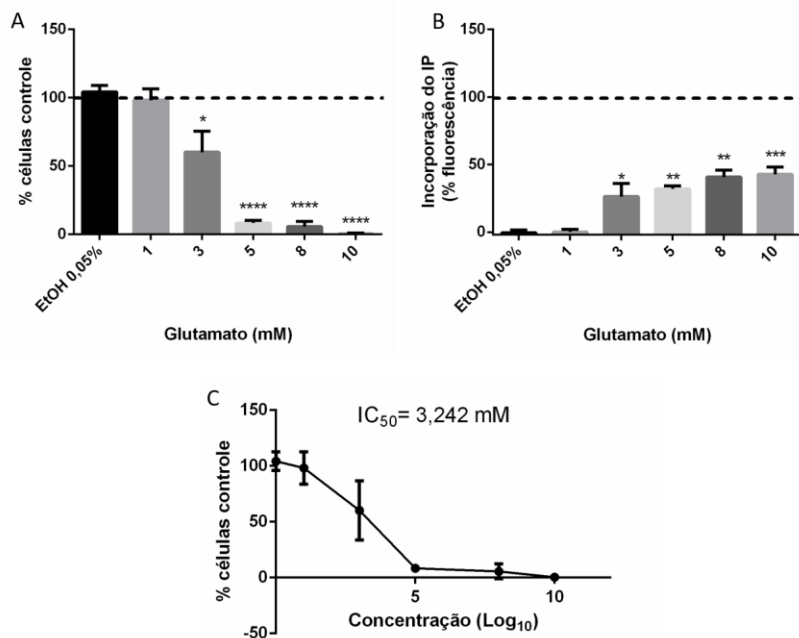
compostos é necessário que as células ainda estejam viáveis e, para isto, foi realizado uma curva de tempo com concentração fixa de glutamato (3 mM) (Figura 9). A exposição ao glutamato (3 mM) causou redução na viabilidade celular e aumento na morte celular somente em 24 horas (Figura 10). Neste sentido, para investigar os mecanismos envolvidos na neuroproteção oferecida pelos compostos análogos ao probucol, a incubação com glutamato foi de 6 horas (tempo sem morte celular evidente).

Figura 6. Desenho experimental para avaliação do efeito citotóxico do glutamato.



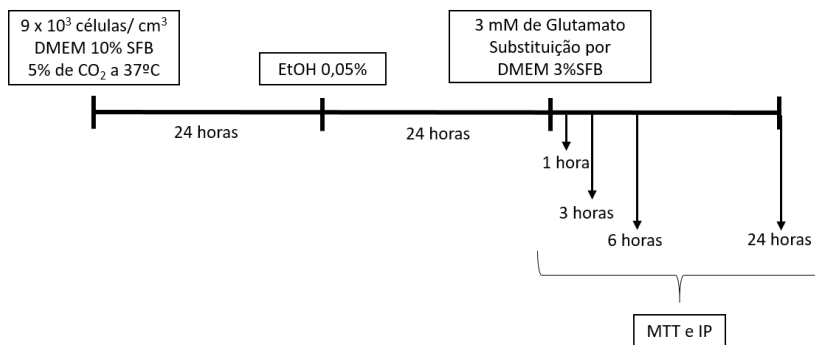
Vinte e quatro horas após o plaqueio, as células foram tratadas com EtOH 0,05% (veículo dos compostos) durante 24 horas. Posteriormente, o meio foi trocado por DMEM com 3% (v/v) de SFB e as células foram expostas ao glutamato na concentração de 1 a 10 mM. A viabilidade celular e a citotoxicidade foram avaliadas 24 h após o tratamento com glutamato através da redução do MTT e incorporação do IP.. Em seguida, realizou-se a determinação do IC₅₀ com o auxílio do programa GraphPad Prism® .

Figura 7. Efeito citotóxico da exposição ao glutamato em células HT22 sobre a viabilidade celular e citotoxicidade.



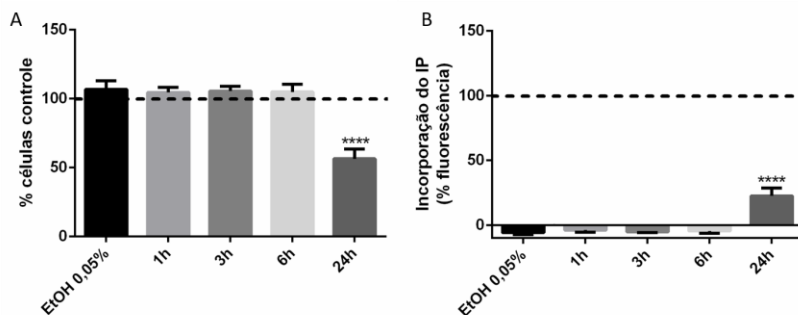
Viabilidade celular (A), citotoxicidade (B) induzidas por glutamato e determinação do IC₅₀. Resultados expressos como percentagem do controle (células não tratadas, 100%). Cada barra representa a média ± erro padrão da média (EPM) de 6 experimentos independentes. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 indicam a diferença quando comparados com o grupo tratado somente com EtOH 0,05% (ANOVA de uma via seguida do teste de post hoc Tukey).

Figura 8. Desenho experimental para avaliação do efeito temporal sobre a viabilidade celular e a citotoxicidade.



Vinte e quatro horas após o plaqueio, as células foram tratadas com EtOH 0,05% (veículo dos compostos) durante 24 horas. Posteriormente, o meio foi trocado por DMEM com 3% (v/v) de SFB e as células foram expostas ao glutamato na concentração 3 mM por 1, 3, 6 ou 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada através da redução do MTT e a citotoxicidade, pela incorporação do IP.

Figura 9. Efeito temporal da exposição ao glutamato em células HT22 sobre a viabilidade celular e citotoxicidade.



Viabilidade celular (A) e citotoxicidade (B) induzidos pela exposição durante 1, 3, 6 e 24 horas ao glutamato. Resultados expressos como porcentagem do controle (células não tratadas, 100%). Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (EPM) de 6 experimentos independentes. **** $p < 0,0001$ indicam a diferença quando comparados com o grupo tratado somente com EtOH 0,05% (ANOVA de uma via seguida do teste de post hoc Tukey).

5.3 COMPOSTOS ANÁLOGOS AO PROBUCOL POSSUEM EFEITO PROTETOR FRENTE A TOXICIDADE OXIDATIVA GLUTAMATÉRGICA

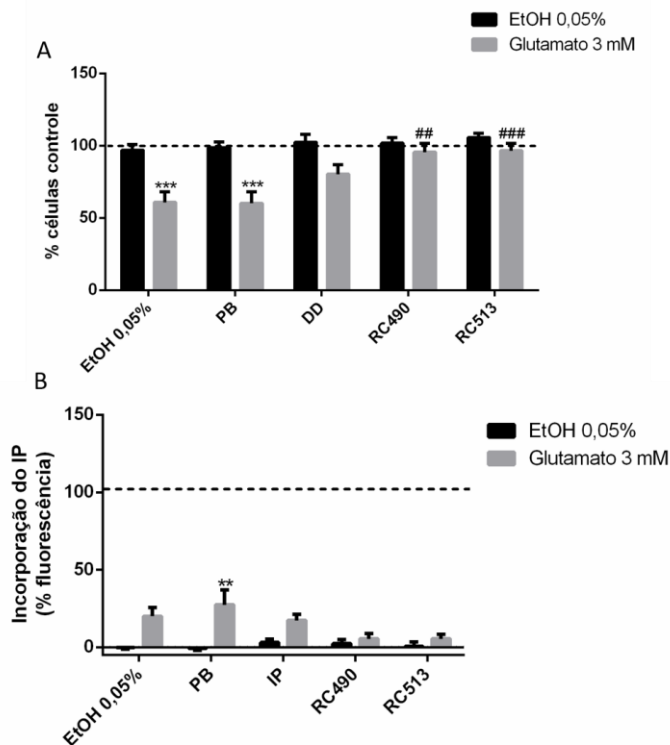
Vinte e quatro horas após o plaqueio, as células foram tratadas com DD, PB e seus análogos e, após 24 horas, foram expostas ao glutamato. A viabilidade celular e a citotoxicidade foram avaliadas após 24 horas de tratamento com glutamato (Figura 11). O glutamato apresentou um efeito significativo na viabilidade celular [$F_{(1,58)}=41,14$; $p<0,0001$] e morte celular [$F_{(1,57)}=26,46$; $p<0,0001$]. O teste de *post hoc* indicou que o PB falhou em proteger as células da morte induzida pelo glutamato na concentração estudada. O pré-tratamento com DD preveniu parcialmente o dano celular induzido pelo glutamato. Os compostos análogos ao probucol foram capazes de proteger totalmente as células do dano celular induzido pelo glutamato (Figura 12).

Figura 10. Desenho experimental para avaliação do efeito neuroprotetor dos compostos análogos ao probucol frente ao dano celular induzido pelo glutamato.



Vinte e quatro horas após o plaqueio, as células foram tratadas com os compostos na concentração de 0,5 μM durante 24 horas em meio DMEM com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). Posteriormente, o meio foi trocado por DMEM com 3% (v/v) de SFB e as células foram expostas ao glutamato na concentração de 3 mM. A viabilidade celular e a citotoxicidade foi avaliada 24 h após o tratamento com glutamato.

Figura 11. Efeito neuroprotetor dos compostos inéditos derivados do PB.

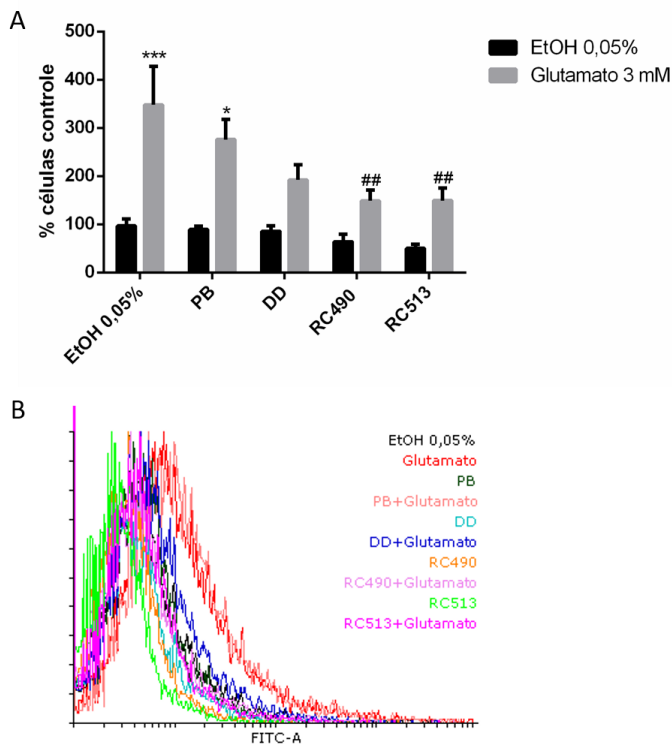


Resultados do ensaio de viabilidade celular foram expressos como percentagem do controle (células não tratadas, 100%) (A), enquanto que os resultados do ensaio de citotoxicidade foram expressos como percentagem de células tratadas com Triton 0,2% (100% de morte) (B). Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (EPM) de 5 experimentos independentes. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ indicam a diferença quando comparados com o grupo tratado com seu respectivo controle. ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ indicam diferença quando comparados com o grupo tratado somente com o glutamato (ANOVA de duas vias seguida do teste de post hoc Tukey).

5.4 COMPOSTOS ANÁLOGOS AO PROBUCOL PREVINEM O AUMENTO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS INDUZIDO POR GLUTAMATO

O tratamento com glutamato por 6 horas induziu um aumento significativo na produção de espécies reativas [$F_{(1,49)}=46,64$; $p<0,0001$], que se manteve o mesmo com o pré-tratamento com PB. O pré-tratamento com DD foi capaz de reduzir parcialmente a produção de espécies reativas induzida pelo glutamato, e interessantemente, os compostos inéditos demonstraram maior eficiência em prevenir este fenômeno (Figura 13).

Figura 12. Efeito do tratamento com DD, PB e seus derivados inéditos sobre a geração de espécies reativas (ERs) de células HT22 expostas ao glutamato.

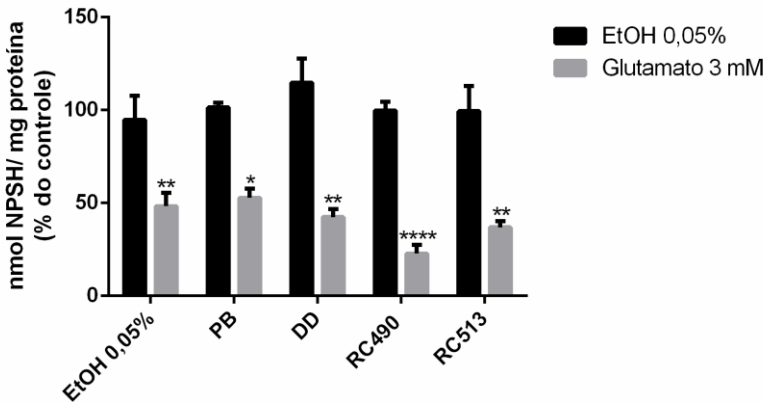


Vinte e quatro horas após o plaqueio, as células foram tratadas com os compostos na concentração de $0,5 \mu\text{M}$ durante 24 horas em meio DMEM com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). Posteriormente, o meio foi trocado por DMEM com 3% (v/v) de SFB e as células foram expostas ao glutamato na concentração de 3 mM. A produção de EROs foi avaliada 6 h após o tratamento com glutamato por meio da detecção de fluorescência da DCF (A). Histograma representativo da fluorescência obtida através de citometria de fluxo (B). Resultados expressos como porcentagem do controle (células não tratadas, 100%). Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (EPM) de 7 experimentos independentes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ indicam a diferença quando comparados com o grupo tratado com seu respectivo controle (tratado somente com veículo). ## $p < 0,01$ indica diferença quando comparados com o grupo tratado somente com o glutamato (ANOVA de duas vias seguida do teste de post hoc Tukey).

5.5 O EFEITO PROTETOR DOS COMPOSTOS ANÁLOGOS AO PROBUCOL FRENTE A TOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA OXIDATIVA NÃO OCORREM DEVIDO À MANUTENÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA

O tratamento com glutamato (6 h) reduziu significativamente (para 48,30%) os níveis de tióis não proteicos em relação ao controle [$F_{(1,36)}=133,1;p < 0,0001$]. O pré-tratamento com PB, DD, RC490 ou RC513 não foram capazes de aumentar os níveis de GSH, bem como prevenir a redução induzida pelo glutamato (Figura 14).

Figura 13. Efeito do tratamento com DD, PB e seus derivados inéditos sobre os níveis de NPSH de células HT22 expostas ao glutamato.



Vinte e quatro horas após o plaqueio, as células foram tratadas com os compostos na concentração de 0,5 μ M durante 24 horas em meio DMEM com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). Posteriormente, o meio foi trocado por DMEM com 3% (v/v) de SFB e as células foram expostas ao glutamato na concentração de 3 mM. Os níveis de NPSH foram avaliados 6 h após o tratamento com glutamato. Resultados expressos como porcentagem do controle (células não tratadas, 100%). Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (EPM) de 5 experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ indicam a diferença quando comparados com o grupo tratado com seu respectivo controle (tratado somente com veículo). (ANOVA de duas vias seguida do teste de post hoc Tukey).

5.6 COMPOSTOS INÉDITOS ANÁLOGOS AO PROBUCOL PROTEGEM DO DANO CELULAR INDUZIDO PELO PERÓXIDO DE *TERC*-BUTILA, PORÉM NÃO POSSUEM AÇÃO DIRETA SOBRE AS ESPÉCIE REATIVAS

No intuito de analisar a capacidade das células pré-tratadas com PB, DD e os compostos inéditos de lidarem com os efeitos oxidantes induzidos pelo do peróxido orgânico, *terc*-butil hidroperóxido (tBuOOH), as células foram pré-tratadas com os possíveis compostos protetores e a viabilidade celular foi avaliada 24 horas após o tratamento com 50 μ M de tBuOOH (Figura 15). O tratamento com tBuOOH reduziu a viabilidade celular para 8,87% em relação ao controle [$F_{(1,30)}=506,7$; $p < 0,0001$]. O pré-tratamento com PB e DD foram incapazes de prevenir o dano celular. No entanto, os compostos inéditos preveniram essa redução: RC490 de maneira parcial, enquanto que o composto RC513 protegeu totalmente do dano induzido pelo tBuOOH (Figura 16) [$F_{(4,30)}=22,63$; $p < 0,0001$].

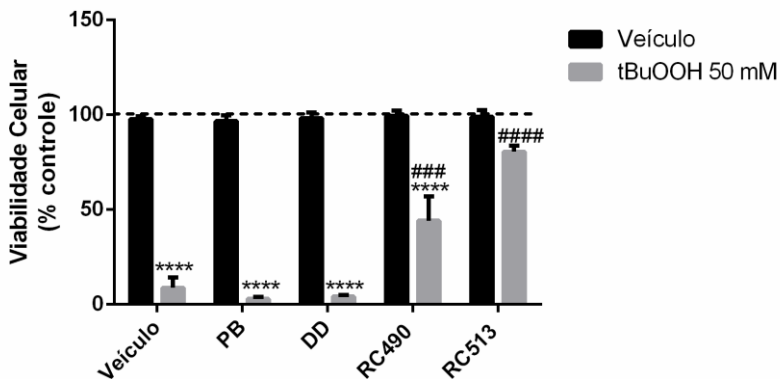
Com a finalidade de investigar se este efeito protetor ocorre devido a atividade antioxidante direta (*scavenger*) dos compostos inéditos, foi realizado o método do DPPH. Todos os compostos, incluindo o controle positivo, Trolox, foram adicionados na concentração de 25 μ M. O composto inédito RC490 e o PB não apresentaram diferença significativa na capacidade *scavenger* em relação à atividade antioxidante do controle positivo, Trolox. Os compostos DD e RC513 apresentaram uma menor capacidade *scavenger* de radicais livres que o Trolox, sugerindo que os compostos possam ter mecanismos diferentes (Figura 17). É importante salientar que o composto com efeito protetor mais expressivo frente à toxicidade induzida por glutamato e tBuOOH, o RC513, possui atividade *scavenger* menor que o probucol (que não apresentou efeito protetor contra a toxicidade induzida por tBuOOH), sugerindo que os efeitos protetores observados provavelmente não se relacionam com atividade antioxidante direta.

Com o objetivo de verificar se o efeito protetor dos compostos inéditos frente ao dano celular induzido pelo tBuOOH ocorre devido ao aumento da detoxificação das espécies reativas provindas deste peróxido, a fluorescência emitida pela oxidação da sonda DCFH-DA foi mensurada por um período de 1 hora e meia após a exposição ao tBuOOH. O tratamento com 50 μ M tBuOOH aumentou os níveis de espécies reativas [$F_{(1,30)}=78,94$; $p < 0,0001$], porém o pré-tratamento com PB, DD, RC490 ou RC513 não foi capaz de diminuir a geração de EROs induzida por este peróxido (Figura 18).

Figura 14. Desenho experimental para avaliação do efeito neuroprotetor dos compostos análogos ao probucol frente ao dano celular induzido pelo tBuOOH.

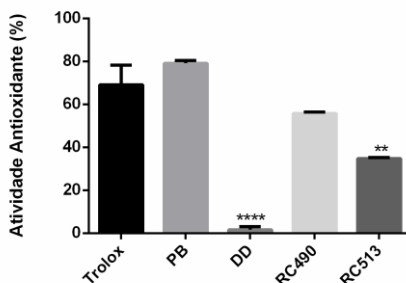


Figura 15. Efeito do pré-tratamento com DD, PB e seus derivados inéditos sobre a viabilidade celular de células HT22 expostas ao tBuOOH.



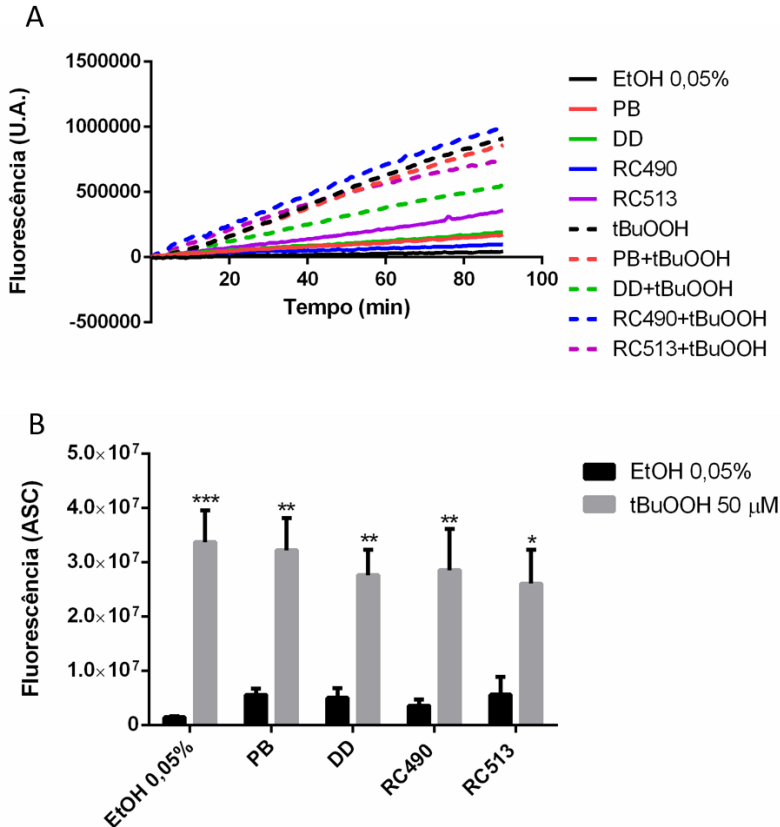
Vinte e quatro horas após o plaqueio, as células foram tratadas com os compostos na concentração de 0,5 µM durante 24 horas em meio DMEM com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). Posteriormente, o meio foi trocado por DMEM com 3% (v/v) de SFB e as células foram expostas a 50 µM de tBuOOH. A viabilidade celular foi avaliada 24 h após o tratamento com tBuOOH. Resultados expressos como porcentagem do controle (células não tratadas, 100%). Cada barra representa a média ± erro padrão da média (EPM) de 4 experimentos independentes. ****p < 0,0001 indica a diferença quando comparados com o grupo tratado com seu respectivo controle (tratado somente com veículo) ****p < 0,0001 indica a diferença quando comparados com o grupo tratado somente com o tBuOOH. ##### p < 0,0001 indicam diferença quando comparados com o grupo tratado somente com o tBuOOH. (ANOVA de duas vias seguida do teste de post hoc Tukey).

Figura 16. Efeito antioxidante dos compostos PB, DD, RC490 e RC513.



Os compostos foram avaliados na concentração final de 25 μ M, através da reação com o radical estável DPPH 500 μ M por 30 minutos a temperatura ambiente. Resultados expressos como percentagem de atividade antioxidante. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos independentes. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ indicam a diferença quando comparados com o controle positivo (Trolox 25 μ M) (ANOVA de uma via seguida do teste de post hoc Tukey).

Figura 17. Efeito do pré-tratamento com DD, PB e seus derivados inéditos sobre a fluorescência emitida pela oxidação da sonda DCFH-DA induzida pelo tratamento com tBuOOH.



Vinte e quatro horas após o plaqueio, as células foram tratadas com os compostos na concentração de 0,5 μ M durante 24 horas em meio DMEM com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). Posteriormente, o meio foi trocado por DMEM com 3% (v/v) de SFB e as células foram expostas a 50 μ M tBuOOH e imediatamente foi realizado o ensaio utilizando o marcador fluorescente DCF. A fluorescência foi avaliada com leituras a cada 1 minuto, durante um período de 1 hora e 30 minutos. Resultados expressos como área sob a curva (ASC). Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (EPM) de 4 experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ indicam a diferença quando comparados com o grupo tratado com seu respectivo controle (tratado somente com veículo) (ANOVA de duas vias seguida do teste de post hoc Tukey).

5.7 EFEITO PROTETOR DOS COMPOSTOS INÉDITOS FRENTE O TRATAMENTO COM CICLOHEXIMIDA E GLUTAMATO

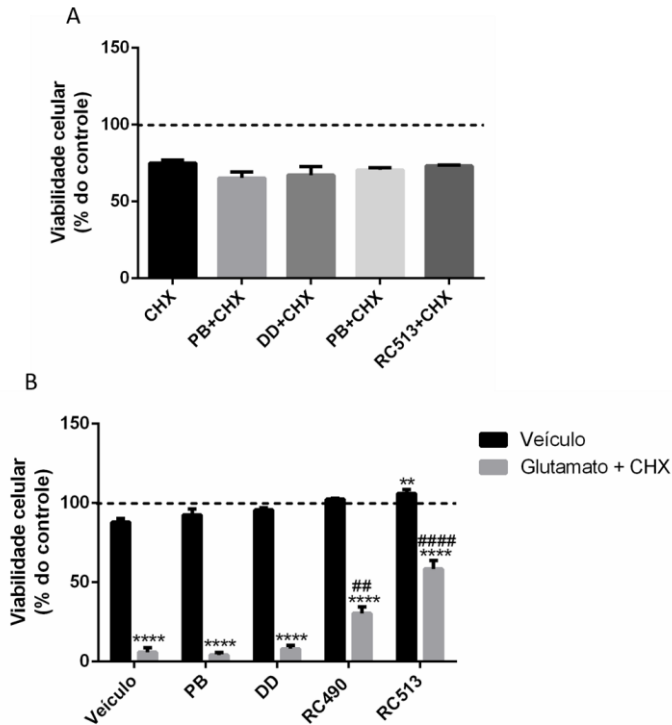
A cicloheximida (CHX), um inibidor da síntese proteica, tem sido utilizada como uma ferramenta experimental para avaliar a contribuição da síntese proteica em eventos celulares e/ou protetores de compostos. As células HT22 foram tratadas concomitantemente com 50 nM de CHX e os compostos estudados. O tratamento com CHX diminuiu a capacidade dos cultivos celulares de reduzir o MTT em cerca de 25% e co-tratamento com os compostos não alterou este fenômeno (Figura 20A). Posteriormente, avaliou-se a capacidade da CHX em reverter o efeito neuroprotetor dos compostos frente ao dano induzido pelo glutamato. Para isto, as células foram tratadas conforme desenho experimental demonstrado na Figura 19. O tratamento com 50 nM de CHX e 3 mM de glutamato reduziu significativamente a viabilidade celular (para valores de 5,97%) [$F_{(1, 20)}=1632$; $p < 0,0001$]. No entanto, o pré-tratamento com os compostos RC490 (30,46%) e RC513 (58,54%) foi capaz de prevenir parcialmente essa redução [$F_{(4,20)}=16,39$; $p < 0,0001$] (Figura 20B).

Figura 18. Desenho experimental para avaliação do efeito do CHX sob o efeito neuroprotetor dos compostos inéditos frente ao dano induzido pelo glutamato.



Vinte e quatro horas após o plaqueio, as células foram tratadas com os possíveis compostos protetores na concentração de 0,5 μM e/ou 50 nM de CHX durante 24 horas em meio DMEM com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). Posteriormente, o meio foi trocado por DMEM com 3% (v/v) de SFB e as células foram tratadas com CHX (50 nM) e glutamato (3 mM). A viabilidade celular foi avaliada 24 h após o tratamento com glutamato.

Figura 19. (A) Efeito do co-tratamento de CHX com DD, PB e seus derivados inéditos sobre a viabilidade celular de células HT22. (B) Efeito do co-tratamento de CHX com DD, PB, RC490 e RC513 sobre a viabilidade celular de células HT22 frente ao dano induzido pelo glutamato.



Resultados expressos como porcentagem do controle (células não tratadas, 100%). Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (EPM) de 5 experimentos independentes. **** $p < 0,0001$ indica a diferença quando comparados com o grupo tratado com seu respectivo controle (tratado somente com veículo). ## $p < 0,01$, #### $p < 0,0001$ indicam diferença quando comparados com o grupo tratado somente com o glutamato + CHX (ANOVA de duas vias seguida do teste de post hoc Tukey).

6 DISCUSSÃO

A expectativa de vida da população vem aumentando gradualmente e é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (UN, 2013). As condições neurodegenerativas possuem eventos patológicos em comum, tais como o estresse oxidativo (SCHEPER e HOOZEMANS, 2015; FREEMAN e TING, 2016; BUENDIA et al., 2016; FEDERICO et al., 2012; ZHAO et al., 2017). O estresse oxidativo ocorre devido a um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a atividade dos mecanismos de defesa antioxidantes e pode ser desencadeado por processos endógenos e exógenos (METODIEWA e KÓSKA, 2000; NIEDZIELSKA et al., 2016).

O probucol é um composto fenólico que possui propriedades antiinflamatórias e antioxidantes (YAMASHITA e MATSUZAWA, 2009). Estudos do nosso grupo de trabalho demonstraram o efeito neuroprotetor desta molécula em modelos *in vitro* e *in vivo* de doenças neurodegenerativas, tais como a Doença de Huntington, Doença de Alzheimer e Doença de Parkinson (COLLE et al., 2012; COLLE et al., 2013; SANTOS et al., 2012; RIBEIRO et al., 2013). Devido ao fato de o PB ter sua utilização limitada devido a efeitos adversos, tais como o prolongamento de repolarização cardíaca e a redução do níveis de HDL, busca-se o desenvolvimento de moléculas que mantenham seus efeitos benéficos, porém, sem apresentar efeitos adversos (TARDIF et al., 2002; McDOWELL et al., 1994; TARDIF et al., 2003).

Neste contexto, o presente estudo buscou avaliar as possíveis ações protetoras de compostos inéditos derivados do probucol (RC 490 e RC 513) contra a toxicidade induzida por glutamato em cultivos de células neuronais, assim como elucidar possíveis mecanismos de ação destes compostos. Este modelo *in vitro* é bastante utilizado para *screening* de fármacos neuroprotetores; nele, o estresse oxidativo não é induzido pela adição direta de oxidantes, mas sim pela depleção de antioxidantes endógenos. Este modelo consiste na utilização da linhagem celular HT22, uma linhagem de neurônios hipocâmpais imortalizados derivados de camundongos que, por não apresentar receptores glutamatérgicos do tipo ionotrópicos, tais como NMDA, ao serem expostas a altas concentrações de glutamato, sofrem basicamente o efeito do bloqueio da captação de cistina pela ação reversa do antiporter x_c^- cistina-glutamato, o que leva à consequente indução de estresse oxidativo e morte celular. O fenômeno celular induzido neste modelo também pode ser denominado de oxitose

ou toxicidade oxidativa glutamatérgica (COYLE e PUTTFARCKEN, 1993; McBEAN et al., 2015; MAHER e DAVIS, 1996).

Os compostos inéditos derivados do PB utilizados neste trabalho foram sintetizados e caracterizados quimicamente pelo Dr. Rômulo Faria Santos Canto, sob coordenação do Prof. Antônio Luiz Braga no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Estes compostos são obtidos por mudanças estruturais que incluem, dentre outras, a troca do átomo de enxofre pelo do selênio (Figura 3). Análises de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas demonstraram uma pureza dos compostos de aproximadamente 100% (dados não mostrados).

Primeiramente, foi avaliada a citotoxicidade dos compostos análogos ao PB. Os resultados mostraram que, em todas as concentrações avaliadas, os compostos não causaram redução na viabilidade celular (Figura 5) e não foram citotóxicos (Figura 6). A partir desse resultado, a concentração de 0,5 μM foi definida para a realização dos experimentos subsequentes.

No intuito de avaliar a neuroproteção destes compostos frente a toxicidade oxidativa glutamatérgica, avaliamos a concentração de glutamato que reduz a viabilidade celular em 50%. O glutamato induziu redução na viabilidade celular e aumento da incorporação do IP de maneira concentração-dependente, corroborando com outros trabalhos que também obtiveram estes resultados (TOBABEN et al. 2011; FUKUI et al., 2009). A partir do cálculo da IC_{50} e, para facilitar a prática experimental, a concentração de glutamato escolhida para realização dos experimentos subsequentes foi a de 3 mM (Figura 7). Fukui e Zhu (2010) também obtiveram o IC_{50} de aproximadamente 3 mM sob condições de exposição muito similares, o que demonstra que este modelo de toxicidade oxidativa glutamatérgica possui boa reprodutibilidade. As células foram então tratadas conforme protocolo demonstrado na Figura 11. O PB, na concentração testada, falhou em proteger as células da morte induzida pelo glutamato. O pré-tratamento com DD preveniu parcialmente a toxicidade celular induzida pelo glutamato. Os compostos inéditos análogos ao PB foram capazes de proteger totalmente as células da diminuição da viabilidade celular induzida pelo glutamato. Estes resultados sugerem que os compostos inéditos possuem maior potencial neuroprotetor que o probucol neste modelo de indução de estresse oxidativo endógeno. Este resultado é bastante relevante tendo em vista os já demonstrados efeitos protetores do PB em estudos prévios (COLLE et al., 2012; COLLE et al., 2013a; SANTOS et al., 2012; RIBEIRO et al., 2013).

Para investigar os mecanismos envolvidos na neuroproteção oferecida pelos compostos análogos ao probucol, é necessário que as células ainda estejam viáveis e, para isto, foi realizado uma curva de tempo conforme protocolo demonstrado na Figura 9. Logo, o tempo de exposição ao glutamato utilizado para os experimentos subsequentes, onde não ocorra diminuição evidente da viabilidade celular, foi o de 6 horas. Esses dados corroboram com outro estudo, onde a morte celular só foi observada após 8 horas de exposição a 3 mM de glutamato (TOBABEN et al., 2011).

A exposição ao glutamato por 6 horas induziu um aumento significativo na produção de espécies reativas (Figura 13). As condições neurodegenerativas afetam a funcionalidade mitocondrial e, consequentemente, contribui para o estresse oxidativo observado nos indivíduos afetados (BUENDIA et al. 2016; NAKANO et al., 2017). O pré-tratamento com PB não alterou o aumento na produção de espécies reativas induzida pelo glutamato; no entanto, o DD foi capaz de prevenir parcialmente o aumento de espécies reativas induzida pelo glutamato e, corroborando com o experimento para verificar o efeito neuroprotetor, os compostos inéditos demonstraram maior eficiência em prevenir este fenômeno (Figura 13).

O tratamento com 3 mM de glutamato por 6 horas reduziu os níveis de tióis não proteicos em 51,7%. Os pré-tratamentos com PB, DD, RC490 e RC513 não foram capazes de prevenir a redução induzida pelo glutamato (Figura 14). Estes resultados sugerem fortemente que o efeito neuroprotetor dos compostos análogos ao PB não ocorrem devido à manutenção dos níveis de GSH. Ainda, os resultados permitem especular que os compostos inéditos derivados do probucol apresentam efeitos protetores contra a toxicidade induzida por glutamato por modular eventos secundários decorrentes da diminuição dos níveis de GSH.

O envelhecimento é um importante fator de risco para as condições neurodegenerativas e um dos fatores que contribuem para isto é a redução no níveis totais de GSH ou da sua forma reduzida (CURRAIS e MAHER, 2013). A depleção de GSH é de particular importância no desenvolvimento e progressão das condições degenerativas (SHIVAKUMAR et al., 1995; MERAD-BOUDIA et al., 1998; MÜLLER et al., 1997). O modelo utilizado neste estudo envolve a indução de estresse oxidativo devido a depleção de GSH, o que pode-se descrever como uma forma de estresse oxidativo endógeno. Portanto, decidimos investigar o efeito desses compostos em um protocolo utilizando uma fonte exógena de espécie reativa de oxigênio, o tBuOOH. O tratamento com tBuOOH (concentração de 50 μ M e incubação por 24 horas) reduziu

a viabilidade celular em 91,13%. PB e DD foram incapazes de prevenir contra este dano celular induzido por tBuOOH. No entanto, o pré-tratamento com os compostos inéditos preveniram essa redução: o RC490 de forma parcial, enquanto que o RC513 protegeu totalmente do dano induzido pelo tBuOOH (Figura 16).

Como os compostos inéditos análogos ao PB foram capazes de prevenir do dano celular induzido tanto pela toxicidade oxidativa glutamatérgica, quanto da exposição a uma espécie reativa de oxigênio diretamente, investigamos se o efeito protetor destes compostos ocorreria devido a atividade antioxidante direta (*scavenger*). O composto inédito RC490 e o PB não apresentaram diferença significativa na capacidade *scavenger* em relação ao controle positivo. Os compostos DD e RC513 apresentaram uma menor capacidade *scavenger* de radicais livres que o Trolox, sugerindo que os compostos inéditos ao PB possam ter mecanismos diferentes (Figura 17). Os efeitos neuroprotetores do composto RC513, tanto no modelo de toxicidade oxidativa glutamatérgica quanto utilizando o tBuOOH, foram mais expressivos que o do PB, mesmo o PB possuindo capacidade *scavenger* superior, sugerindo que os efeitos observados provavelmente não se relacionam com a capacidade antioxidante direta.

No intuito de investigar se o efeito protetor dos compostos inéditos frente ao dano celular induzido pelo tBuOOH ocorre devido ao aumento da sua detoxificação, a fluorescência emitida pela sonda DCF-DA foi mensurada por um período de 1 hora e meia. O pré-tratamento com PB, DD, RC490 ou RC513 não foi capaz de aumentar a detoxificação de espécies reativas induzida por este peróxido (Figura 18)

Um composto pode reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio através de sua capacidade antioxidante direta e/ou modulação dos sistemas antioxidantes. Em um modelo de AVE isquêmico, onde a artéria medial cerebral é ocluída, o PB aumentou a expressão gênica e os níveis proteicos da enzima peroxiredoxina 2, do fator de transcrição *forkhead box* (Foxo3a), o qual está envolvido no aumento da expressão de enzimas antioxidantes, e do Nrf2 (DU et al., 2012). Colle e colaboradores (2013a) demonstraram, em um modelo experimental *in vivo* de Doença de Huntington utilizando o 3-NP, que o PB aumenta a atividade da enzima GPX e os níveis de GSH. Outro trabalho utilizando um modelo experimental *in vitro* de Doença de Huntington demonstrou que o pré-tratamento com succinobucol aumentou os níveis de GSH e a atividade da enzima glutathione cisteína ligase, uma enzima limitante para a síntese de GSH (COLLE et al. 2016). Esses dados sugerem que o PB e seu derivado succinobucol possam modular fatores de transcrição que

estimulam a transcrição de enzimas antioxidantes. Com a finalidade de investigar se os compostos inéditos poderiam estimular a síntese de proteínas, utilizou-se um inibidor de síntese proteica, CHX. O tratamento com CHX diminuiu a capacidade das células HT22 de reduzir o MTT em cerca de 25% e o co-tratamento com os compostos não alterou este fenômeno. Esta redução do metabolismo mitocondrial foi utilizada para confirmar que a concentração de 50 nM de CHX utilizada estava tendo algum efeito no metabolismo celular (Figura 20A). Posteriormente, foi investigado se a inibição da síntese proteica seria capaz de reverter o efeito neuroprotetor dos compostos frente ao dano induzido pelo glutamato. O tratamento concomitante com 50 nM de CHX e 3mM de glutamato reduziu a viabilidade celular em 94,03%. No entanto, o pré-tratamento com os compostos RC490 e RC513 foi capaz de prevenir parcialmente essa redução (Figura 20B). Estes dados suportam de forma inicial a ideia de que a ação neuroprotetora dos compostos inéditos análogos ao PB não estaria envolvendo a modulação da expressão de proteínas. No entanto, estes resultados são preliminares e devem ser confirmados através de ajustes no protocolo original (utilização de uma concentração de CHX que não altera a viabilidade celular). Além disso, investigações futuras devem buscar elucidar os eventos moleculares específicos envolvidos neste fenômeno de neuroproteção.

Dados não publicados do nosso grupo de pesquisa, utilizando compostos análogos ao PB no mesmo modelo de toxicidade oxidativa glutamatérgica em células HT22, demonstraram que os compostos preveniram o aumento dos níveis de superóxidos mitocondriais. Fukui e Zhu (2010) constataram o efeito crítico da atividade da SOD2, isoforma da enzima superóxido dismutase presente na mitocôndria na toxicidade oxidativa glutamatérgica, através do knockdown seletivo da SOD2, levando ao aumento na produção de superóxido mitocondrial, a perda da morfologia e funções mitocondriais normais. Este trabalho também demonstrou que ao superexpressar SOD2 nas células HT22 aumenta a resistência desta linhagem a toxicidade oxidativa glutamatérgica. Um trabalho que estudou o efeito do selênio no modelo utilizado neste trabalho demonstrou um efeito neuroprotetor com redução na produção de O_2^- e redução na fissão mitocondrial (MA et al. 2017). Sugere-se que os compostos análogos ao PB possam atuar na prevenção dos eventos secundários da toxicidade oxidativa glutamatérgica, como aqueles derivados da diminuição dos níveis de GSH. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos no efeito neuroprotetor.

7 CONCLUSÃO

Após a finalização deste projeto, pode-se concluir que os compostos inéditos derivados do PB possuem potencial neuroprotetor maior que o probucol e o DD frente ao dano celular induzido pelo glutamato na linhagem HT22. Ainda, sugere-se que estes compostos possam atuar na prevenção dos eventos secundários da toxicidade oxidativa glutamatérgica, como aqueles derivados da diminuição dos níveis de glutathione. No que refere-se ao envolvimento da síntese de proteínas com atividade antioxidante nos efeitos protetores observados, acredita-se que mais estudos são necessários tendo em vista que não está claro até o momento qual é o real efeito da CHX (na concentração utilizada) no modelo experimental; a ocorrência de efeitos pró-oxidantes da CHX não podem ser descartadas até o momento.

Desta forma, estudos adicionais são necessários para compreender melhor os mecanismos envolvidos na propriedade neuroprotetora destes compostos, bem como o seu efeito em outros modelos de condições neurodegenerativas que não possuam as limitações deste modelo *in vitro* utilizado, tais como a ausência de interações entre diferentes tipos celulares e de eventos fisiológicos mais complexos que modulam a farmacocinética dos compostos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBIN, R. L. ; MILLER, R. A. Mini-review : Retarding aging in murine genetic models of neurodegeneration. **Neurobiology of Disease**, v.65, p.73-80, 2016.

AOYAMA, K. et al. Regulation of Neuronal Glutathione Synthesis. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.108, p.227-238, 2008.

BANNAI, S. Exchange of cysteine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry**, v.15, p.2256-2263, 1986.

BANNAI, S.; KITAMURA, E. Transport of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture. **The Journal of Biological Chemistry**, v.255, p.2372-2376, 1980.

BARBOSA, N. B. V. et al. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions**, v.163, p.230-238, 2006.

BEART, P. M. Synaptic signaling and its interface with neuropathologies: snapshots from the past, present and future. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p.76-90, 2016.

BENDIX, I. et al. Hiperoxia changes the balance of thioredoxin/peroxiredoxin system in the neonatal rat brain. **Brain Research**, v. 1484, p.68-75, 2012.

BRAND-WILLIAMS, W. ; CUVELIER, M. E. ; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30, 1995.

BRENNAN, A. M. NADPH oxidaase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. **Nature Neuroscience**, v. 12, p.857-863, 2009

BORDJI, K. et al. Activation of extrasynaptic, but not Synaptic, NMDA receptor modifies amyloid precursor protein expression pattern and increases amyloid- β . **Journal of Neuroscience**, v. 30, p.15927-15942, 2010.

BUENDIA, I. et al. Nrf2-ARE pathway : An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, v.157, p.84-104, 2016.

BUTTERFIELD A. E POCERNICH, C. B. The glutamatergic system and Alzheimer's disease : therapeutic implications. **CNS Drugs**, v.17, p.641-652, 2003.

CHAMORRO, A. et al. Neuroprotection in acute stroke : targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. **Lancet Neurology**, v. 15, p.869-88, 2017.

CHAGAS, P. M. et al. Evaluation of the pharmacological properties of salicyc acid-derivate organoselenium: 2-hydroxy-5-selenocyanatobenzoic acid as an anti-inflammatory and nociceptive compound. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.118, p.87-95, 2014.

COLLE, D. et al. Probucol increases striatal glutathione peroxidase activity and protects against 3-nitropropionic acid-induced pro-oxidative damage in rats. **Plos One**, v. 8, p.1-15, 2013a.

COLLE, D. et al. Succinobucol versus probucol: Higher efficiency of succinobucol in mitigating 3-NP-induced brain mitochondrial dysfunction and oxidative stress in vitro. **Mitochondrion**, v. 13, p.125-133, 2013b.

COLLE, D. et al. Probucol modulates oxidative stress and excitotoxicity in Huntington's disease models in vitro. **Brain Research Bulletin**, v.87, p.397-405, 2012.

COLLE, D. et al. Succinobucol, a lipid-lowering drug, protects against 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress in SH-SY5Y cells via upregulation of glutathione levels and glutamate cysteine ligase activity. **Molecular Neurobiology**, v. 53, p.1280-1295, 2016.

COYLE, J.T.; PUTTFARCKEN, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science**, v. 262, p.689-695, 1993.

CURRAIS, A. e MAHER, P. Functional Consequences of Age-Dependent Changes in Glutathione Status in the Brain. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, p. 813-822, 2013.

DAVIS, S. e PENNYPACKER, K. R. Targeting antioxidant enzyme expression as a therapeutic strategy for ischemic stroke. **Neurochemistry International**, In Press, 2016.

DAWSON, T. M. e DAWSON, V. L. Mitochondrial mechanisms of neuronal cell death: potential therapeutics. **The Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.57, p.437-454, 2017.

DE LA TORRE, M. R. et al. Human aging brains disorders: role of antioxidant enzymes. **Neurochemical Research**, v.21, p.885-888, 1996.

DIXON, S. J. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. **Cell**, v.149, p.1060-1072, 2012.

DRIGEN, R. et al. Peroxide Detoxification by Brain Cells. **Journal of Neuroscience Research**, v.79, p.157-165, 2005.

DU, Y. et al. Probucol and atorvastatin in combination protect rat brains in MCAO model: Upregulating Peroxiredoxin2, Foxo3a and Nrf2 expression. **Neuroscience Letters**, v.509, p.110-115, 2012.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.82, n.1, May, p. 70-7, 1959.

FALKOWSKI, P. G. e GODFREY, L. V. Electrons, life and the evolution of Earth's oxygen cycle. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, v. 363, p. 2705-2716, 2008.

FAN, H. et al. Targeting new candidate genes by small molecules approaching neurodegenerative disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, p.1-23, 2016.

FEDERICO, A. et al. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. **Journal of the Neurological Sciences**, v.322, p.254-262, 2012.

FEIGIN, V. L. et al. Stroke epidemiology : a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. **The Lancet Neurology**, v. 2, p.43-53, 2003.

FREDERIKSEN, K. et al. Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS. *Neuron*, v.1, p.439-448, 1988.

FREEMAN, L. C. ; TING, J. P. Y. The pathogenic role of the inflammasome in neurodegenerative diseases. **Journal of Neurochemistry**, v.136, p.29-38, 2016.

FUKUI, M. et al. Mechanism pf glutamate-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 617, p.1-11, 2009.

FUKUI, M. e ZHU, B. T. Mitochondrial superoxide dismutase SOD2, but not citosolic SOD1, plays a critical role in protection against glutamate-induced oxidative stress and cell death in HT22 neuronal cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, p.821-830, 2010.

GHIO, S. et al. Interaction of α -synuclein with biomembranes in Parkinson's disease-role of cardiolipin. **Progress in Lipid Research**, v.61, p.73-82, 2016.

GOLDSTEIN, L. B. et al. Primary Prevention of Isquemic Stroke. **Stroke**, v. 37, p. 1683-1633, 2006.

GREENOUGH, M. A. et al. Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, v. 62, p.540-555, 2013.

HANE, F. T. et al. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 1: Pathology. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 57, p.1-28, 2017.

Human Development Report 2014. Sustaining Human Progress: Reducing Vulnerabilities and Building Resilience. New York: United Nations Development Programme, 2013. Acesso em: jan 2016.

IBRAHIM, M. et al. 1-(2-(2-(2-(1-aminoethyl)phenyl)diselanyl)phenyl)ethanamine: an amino organoselenium compound with interesting antioxidant profile. **Toxicology in Vitro**, v.28, p.524-530, 2014.

KUNSCH, C. et al. Selective inhibition of endothelial and monocyte redox-sensitive genes by AGI-1067: a novel antioxidant and anti-inflammatory agent. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 308, p.820-829, 2004.

KRITIS, A.A. et al. Researching glutamate-induced cytotoxicity in different cell lines : a comparative/collective analysis/study. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, p.1-18, 2015.

LI, Y. et al. A Role for 12-lipoxygenase in Nerve Cell Death Caused by Glutathione. **Neuron**, v. 19, p.453-463, 1997.

LIOCHEV, S.I e FRIDOVICH, I. The Role of O_2^- in the production of HO : in vitro and in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, v.16, p.29-33, 1994.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, n.1, Nov, p.265-75, 1951.

MA et al. Selenium suppresses glutamate-induced cell death and prevents mitochondrial morphological dynamic alterations in hippocampal HT22 neuronal cells. **BMC Neuroscience**, v.18, p.1-14, 2017.

MAHER, P. ; DAVIS, J. B. The Role of Monoamine Metabolism in Oxidative Glutamate Toxicity. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, p.6394-6401, 1996.

MANZANERO, S. et al. Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke : Sources and contribution to cell injury. **Neurochemistry International**, v. 62, p.712-718, 2013.

MATTSON, M. Glutamate and Neurotrophic Factors in Neuronal Plasticity and Disease. **Annual New York Academy of Sciences**, v. 1144, p.97-112, 2008.

McBEAN, G.J. et al. Thiol redox homeostasis in neurodegenerative disease. **Redox Biology**, p.186-194, 2015.

McDOWELL, I.F. et al. The effect of probucol and vitamin E treatment on the oxidation of low-density lipoprotein and forearm vascular responses in humans. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 24, p.759-765, 1994.

MERAD-BOUDIA, M. Mitochondrial impairment as an early event in the process of apoptosis induced by glutathione depletion in

neuronal cells: relevance to Parkinsons disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, p.645-655, 1998.

METODIEWA, D.; KÓSKA, C. Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species: Relevance to Cyto(neuro)toxic Events and Neurologic Disorders. An Overview. **Neurotoxicity Reserch**, v. 1, p. 197-233, 2000.

MICHIELS, C. et al. Importance of Se-Glutathione Peroxidase, Catalase, and Cu/Zn-SOD for Cell Survival Against Oxidative Stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v.17, p.235-248, 1994.

MORÁN, M. et al. Mitochondrial respiratory chain dysfunction: Implications in neurodegeneration. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, p.595-609, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 63, p. 45-55, 1983.

MOZZAFARIAN, D. et al. Heart Disease and Stroke Statistics – 2016 Update: A Report From American Heart Association. **Circulation**, v. 133, p.e38-e360, 2016.

MÜLLER, W. E. G. et al. Protection of Flupirtine on β -Amyloid-Induced Apoptosis in Neuronal Cells in Vitro: Prevention of Amyloid-Induced Glutathione Depletion. **Journal of Neurochemistry**, v.68, p.2371-2377, 1997.

MURPHY, T.H. et al. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cysteine transport leading to oxidative stress. **Neuron**, v. 2, p.1547-1558, 1989.

MUTISYA, E.M. et al. Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's Disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 63, p.2179-2183, 1994.

NAGLEY, P. et al. Multifaceted deaths orchestrated by mitochondrial in neurons. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1802, p.167-185, 2010.

NAKANO, Y. et al. Time-dependent Change of In Vivo Optical Imaging of Oxidative Stress in a Mouse Stroke Model. **Journal of Neuroscience Research**, In Press, 2017.

NIEDZIELSKA, E. et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Molecular Neurobiology**, v. 53, p.4094-4125, 2016.

NIRANJAN, R. Molecular basis of ethiological implications in Alzheimer's disease: focus on neuroinflammation. **Molecular Neurobiology**, v. 48, p.412-428, 2013.

OBESO, J. A. et al. Functional organization of the basal ganglia: Therapeutic implications for Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 23, p.S548-S559, 2008.

PACHER, P. et al. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiological Reviews**, v.87, p.315-424, 2007.

PARK, M. H. et al. Roles of peroxiredoxins in cancer, neurodegenerative diseases and inflammatory diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 163, p.1-23, 2016.

PARK, S. Y. et al. Neuroprotective effects of α -isocubebenol on glutamate-induced neurotoxicity. **Environmental Toxicology on Pharmacology**, v. 40, p.549-556, 2015.

PETEGNIEF, V., FRIGULS, B., SANFELIU, C., SUÑOL, C., PLANAS, A.M. ZP **Journal Biological Chemistry**. v. 278, p. 29552–29559, 2003.

PRZEDBORSKI, S. The two-century journey of Parkinson's Disease research. **Nature Reviews Neuroscience**, v.18, p.251-259, 2017.

RAEFSKY, S. M. e MATTSON, M. P. Adaptive responses of neuronal mitochondria to bioenergetics challenges: roles in neuroplasty and disease resistance. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 102, p.203-216, 2017.

REGLODI, D. et al. Review on the Protective Effects of PACAP in models of neurodegenerative diseases *in vitro* and *in vivo*. **Current Pharmaceutical Design**, v.17, p.962-972, 2011.

RIBEIRO, P. R. et al. Probulcol affords neuroprotection in a 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease. **Neurochemical Research**, v.38, p. 660-668, 2013.

ROTRUCK, J. T. et al. Slenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, v.179, p.588-590, 1973.

SANTOS, D.B. et al. Probulcol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid β peptide in mice. **Experimental Neurology**, v. 233, p.767-775, 2012.

SATO, H. et al. Molecular cloning and expression of human xCT, the light chain of amino acid transport system x_c^- . **Antioxidants & Redox Signaling**, v.2, p.665-671, 2000.

SCHEPER, W. ; HOOZEMANS, J. J. M. The unfolded protein response in neurodegenerative diseases : a neuropathological perspective. **Acta Neuropathologica**, v.130, p.315-331, 2015.

SHIVAKUMAR, B. R. et al. Glutathione and Protein Thiol Homeostasis in Brain During Reperfusion After Cerebral Ischemia. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 274, p.1167-1173, 1995.

SILVESTRE, F. et al. Effects of organoselenium compounds on early and late brain biochemical alterations in sepsis-survivor rats. **Neurotoxicity Research**, v.26, p.382-391, 2014.

SOMMER, C. J. Ischemic stroke : experimental models and reality. **Acta Neuropathologica**, v. 133, p.245-261, 2017.

TAN, S. et al. Oxytosis: a novel form of programmed cell death. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 1, p.497-506, 2001.

TARDIF, J.C. et al. Prevention of restenosis with antioxidants: mechanisms and implications. **American Journal of Cardiovascular Drugs**, v. 2, p.323-334, 2002.

TARDIF, J.C. et al. Effects of AGI-1067 and probucol after percutaneous coronary interventions. **Circulation**, v. 107, p.552-558, 2003.

The World Health Report 2000, Health Systems: Improving performance. Disponível em: <http://www.who.int/whr/2000/en/>
Acesso em: mar 2017.

TOBABEN, S. et al. Bid-mediated mitochondrial damage is a key mechanism in glutamate-induced oxidative stress and AIF-dependent cell death in immortalized HT-22 hippocampal neurons. **Cell Death and Differentiation**, v.18, p.282-292, 2011.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v.160, p.1-40, 2006.

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

VRIES, H. E. et al. Nrf2-induced protection: A promising target to counteract ROS-mediated damage in neurodegenerative disease? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 45, p.1375-1383, 2008.

WATTS, J. C. e PRUSINER, S. B. β -amyloid prions and the pathobiology of Alzheimer's Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, In Press, 2017.

WEN, X. et al. Neuroprotective effect of astaxanthin against glutamate-induced cytotoxicity in HT22 cells : involvement of the Akt/GSK-3 β pathway. **Neuroscience**, v.303, p.558-568, 2015.

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

ZHANG, M. et al. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. **Progress in Neurobiology**, v.100, p.30-47, 2013.

ZHAO, et al. Regulation of microglial activation in stroke. **Acta Phamacologica Sinica**, In Press, 2017.