

Ruth Liliám Quispe Gaspar

**EFEITO CITOPROTETOR DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DE
SELÊNIO CONTRA O DANO OXIDATIVO INDUZIDO POR
PERÓXIDO EM UMA LINHAGEM DE CÉLULA NEURONAL
HT22: ENVOLVIMENTO DO SISTEMA ANTIOXIDANTE
DEPENDENTE DE GLUTATIONA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Doutora em Neurociências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Andreza Fabro de Bem

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Farina

Florianópolis
2018

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

Quispe Gaspar, Ruth Liliám

Efeito citoprotetor de compostos orgânicos de selênio contra o dano oxidativo induzido por peróxido em uma linhagem de célula neuronal HT22: Envolvimento do sistema antioxidante dependente de glutathiona / Ruth Liliám Quispe Gaspar ; orientadora, Andreza Fabro de Bem, coorientador, Marcelo Farina, 2018.

183 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

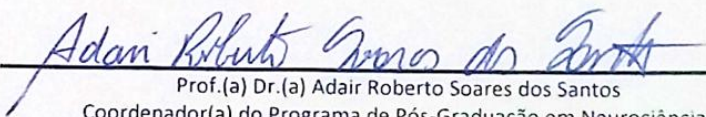
1. Neurociências. 2. (PhSe)₂ e RC513. 3. Glutathiona peroxidase. 4. Disfunção mitocondrial. 5. Células HT22 expostas ao tBuOOH. I. Fabro de Bem, Andreza. II. Farina, Marcelo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. IV. Título.

"Efeito citoprotetor de compostos orgânicos de selênio contra o dano oxidativo induzido por peróxido em uma linhagem de célula neuronal HT22: envolvimento do sistema antioxidante dependente de glutatona"

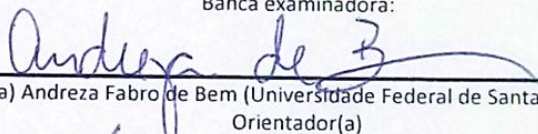
Por

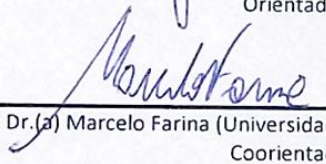
Ruth Liliám Quispe Gaspar

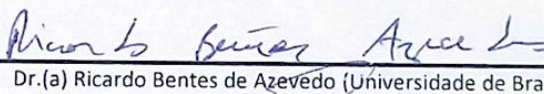
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (011/PGN/2018) do Programa de Pós-Graduação em Neurociências - UFSC.

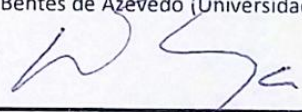

Prof.(a) Dr.(a) Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Neurociências

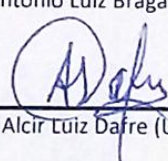
Banca examinadora:


Dr.(a) Andreza Fabro de Bem (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)


Dr.(a) Marcelo Farina (Universidade Federal de Santa Catarina)
Coorientador(a)


Dr.(a) Ricardo Bentes de Azevedo (Universidade de Brasília)


Dr.(a) Antonio Luiz Braga (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr.(a) Alcir Luiz Dafre (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 20 de abril de 2018.

*Dedico este trabalho a meus pais,
Eusebio e Paulina, irmãos e Michael
por todo o apoio, carinho e amor que
sempre me deram.*

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos sinceros a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho pudesse ser desenvolvido. Em especial, gostaria de agradecer:

À minha orientadora Dra. Andreza Fabro de Bem, pela oportunidade que me propiciou, desde o primeiro dia que falei com ela, sempre foi muito receptiva. Pela orientação, por acreditar e depositar sua confiança para realizar o presente trabalho. Também, pelas sugestões especialmente nos experimentos de respirometria, já que esses resultados sempre nós deixavam muito felizes e com novas curiosidades a pesquisar. E pela luz que brindou no trabalho ao me convidar a formar parte do seu projeto de deselenetos.

À meu co-orientador Dr. Marcelo Farina, quero agradecer pelas ideias e conversas científicas e mais, por aquelas que surgiram durante este trabalho, cada vez que mostrava os avanços da tese, algumas vezes o resultado desses avanços foi frustrante e outras muito gratificantes. Especificamente, durante a padronização para medir a atividade enzimática nestas células neuronais. Valeu a pena todo o esforço e dedicação, sinceramente foi um amadurecimento profissional e um grande aprendizado.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), por acolher estudantes estrangeiros, e brindar serviços como RU, BU, etc., os quais melhoram nossa estância aqui e nós motivam a fazer um bom trabalho. Aos professores da Pós-graduação de Neurociências, que colaboraram na minha formação de doutoranda. Ao Prof. Alcir Dafré por gentilmente ter nos proporcionado as células HT22 trazidas desde o *Salk Institute*. À Fundação de Amparo à Pesquisa e inovação do estado de Santa Catarina (FAPESC), pela bolsa de doutorado. Ao secretário da Pós-graduação de Neurociências, Nivaldo, por sua disponibilidade brindada durante estes 4 anos.

A todo o pessoal do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), especialmente graças pela sua paciência (Vanessa e Dennis) e pela capacitação para nós tornar usuários credenciados, o qual facilitou muito a disponibilidade dos equipamentos na hora das atividades experimentais.

Aos colegas do Laboratório de Neuroquímica I (Leticia, Gabriela, Daiane, Marcus e Tine) e do Laboratório Experimental em Neuropatologias (LEN) (Dirleise, Diones, Aline, Rafaela, Victoria, e Glorister). Pelas trocas de ideias científicas, e sobre todo bate papo! Algumas vezes na rota do açai ou no barzinho. A Anita e Mauro, amigos

desde o mestrado, fizeram nossa estância em Florianópolis muito mais agradável.

A minha família, pelo carinho, compreensão e incentivo, que apesar de estar longe sempre torceram por mim. A meu pai Eusebio, embora não esteja entre nós, sempre me incentivou a ir em frente. A minha mãe Paulina, graças pela tua paciência e amor. A meus irmãos pelo esforço, apoio e carinho, obrigada Enrique e Jorge.

A Michael, você é meu parceiro e melhor amigo. Obrigada por empreender esta caminhada comigo, ao vir ao Brasil, sem ter nada seguro para ti, nem entender o português no começo, mas eu sabia que você conseguiria somente te dar um empurjon! Que apesar de ter linhas de pesquisa diferentes, tuas dicas nos experimentos da biologia molecular e em outros sempre foram bem vindas. Quero agradecer por estar a meu lado neste dia, pelo teu carinho, paciência e amor. Te amo muito bem! Agora bem o melhor!

A Deus por me escutar e me dar serenidade para não perder o foco, e por me permitir conhecer esta Ilha linda, maravilhosa.

RESUMO

O estresse oxidativo celular é um fator importante no desenvolvimento de várias doenças neurodegenerativas, especialmente as doenças de Alzheimer e de Parkinson. Dentre as regiões do encéfalo, o hipocampo, estreitamente ligado à memória e cognição, é comumente afetado em várias doenças neurodegenerativas. Na última década, um especial interesse tem sido dado ao estudo de compostos com propriedades protetoras que permitem prevenir ou reduzir o dano oxidativo nestas doenças neurodegenerativas. Neste contexto, no presente estudo foram avaliados os efeitos protetores de dois compostos orgânicos de selênio, (PhSe)₂ e RC513, em uma cultura de células neuronais hipocâmpais HT22 expostas ao hidroperóxido de terc-butila (tBuOOH) (modelo de estresse oxidativo *in vitro*), bem como os mecanismos moleculares envolvidos na citoproteção. As células HT22 foram pré-tratadas com 2 µM de (PhSe)₂ ou RC513 durante 48 horas e posteriormente expostas a tBuOOH (40 µM) durante: *i*) 12 h para avaliar a viabilidade e morte celular utilizando o ensaio MTT e IP; *ii*) 2-4 h para avaliar a taxa de consumo de oxigênio, usando respirometria de alta resolução; e *iii*) 2-4 h para avaliar a geração de espécies oxidantes usando H₂DCFDA e MitoSOX. Os níveis de transcritos de *Gpx1* e *Gclc* e atividade da glutationa peroxidase (GPx), níveis de glutationa (GSH) e tióis não proteicos (NPSH) também foram avaliados nas células HT22 após o pré-tratamento com (PhSe)₂ ou RC513. O perfil temporal (3 h até 24 h) dos níveis de transcritos de genes alvos de Nrf2 e FoxO (*Prdx2*, *Prdx3*, *Prdx5*, *Txnrd2*, *Sod2*, *Cat*, *HO-1*, *Gpx1* e *Gclc*) também foi avaliado. Os resultados mostram que o RC513 aumentou a expressão dos genes *Gpx1*, *Prdx2* e *Prdx5*, enquanto o (PhSe)₂ incrementou a expressão dos genes *Gpx1*, *Cat*, *HO-1* e *Gclc*. Estes resultados sugerem que ambos compostos ativam as vias de sinalização Nrf2 e/ou FoxO nestas células. Ambos os compostos foram capazes de proteger as células HT22 contra o estresse oxidativo induzido pelo tBuOOH. A citoproteção mediada pelos compostos foi acompanhada da habilidade de ambos em reduzir a geração de oxidantes e prevenir a disfunção mitocondrial. O pré-tratamento das células com ambos compostos aumentou a atividade GPx e os níveis de transcritos do gene *Gpx1*. Alguns efeitos distintos foram verificados, como por exemplo, o (PhSe)₂ além de aumentar a atividade GPx, este composto modulou positivamente os transcritos da *Gclc* correlacionando-se com o incremento dos níveis de GSH e NPSH nas células HT22, enquanto o RC513 não induziu modificações nestes

parâmetros. Adicionalmente avaliamos o efeito do (PhSe)₂ e do RC513 (0,5 µM e 2 µM) sobre a citotoxicidade induzida por outros agentes estressores (SIN-1, glutamato e MeHg). Os resultados indicaram que o pré-tratamento com (PhSe)₂ ou RC513 (2 µM) evitou a diminuição da viabilidade celular após exposição ao tBuOOH (400 µM), SIN-1 (2 mM), glutamato (10 mM) e MeHg (1000 nM). Um curto período de pré-tratamento com RC513 (2 µM, por 3 h) teve uma eficiência protetora melhor do que o (PhSe)₂ mantendo a viabilidade celular após a exposição prolongada ao tBuOOH (40 µM). Além disso, RC513 (0,5 µM) foi mais efetivo do que (PhSe)₂ na citoproteção frente ao tBuOOH (40 µM), glutamato (5 mM) e MeHg (1000 nM). Em resumo, este estudo demonstra, pela primeira vez, os efeitos protetores dos compostos (PhSe)₂ e RC513 em células neuronais HT22 expostas a oxidantes, mostrando algumas diferenças no mecanismo de proteção destes compostos. Os resultados do presente estudo sugerem e indicam que estes compostos são promissores como agentes neuroprotetores em condições relacionadas ao estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial.

Palavras chaves: Derivados de Probucof, RC513, (PhSe)₂, Glutathione peroxidase, Disfunção mitocondrial, Células HT22, tBuOOH.

ABSTRACT

Cellular oxidative stress is an important factor in the development of various neurodegenerative diseases, especially Alzheimer's and Parkinson's diseases. Among the regions of the brain, the hippocampus, closely linked to memory and cognition, is commonly affected in several neurodegenerative diseases. In the last decade, a special interest has been given to the study of compounds with protective properties that allow preventing or reducing oxidative damage in these neurodegenerative diseases. In this context, the protective effects of two organic selenium compounds (PhSe)₂ and RC513 were evaluated in a culture of HT22 hippocampal neuronal cells exposed to tert-Butyl hydroperoxide (tBuOOH) (*in vitro* oxidative stress model), as well as the molecular mechanisms involved in their cytoprotection. HT22 cells were pretreated with 2 μM of (PhSe)₂ or RC513 for 48 hours and then exposed to tBuOOH (40 μM) for: *i*) 12 h to assess viability and cell death using the MTT and PI assay; *ii*) 2-4 h to evaluate the oxygen consumption rate (OCR), using high-resolution respirometry; and *iii*) 2-4 h to evaluate the generation of oxidant species using H₂DCFDA and MitoSOX. Levels of *Gpx1* and *Gclc* transcripts and Glutathione peroxidase (GPx) activity, glutathione (GSH) and the non-protein sulfhydryls (NPSH) levels were also evaluated in HT22 cells after pre-treatment with (PhSe)₂ or RC513. The time profile (3 h to 24 h) of transcript levels of Nrf2- and FoxO-target genes (*Prdx2*, *Prdx3*, *Prdx5*, *Txnrd2*, *Sod2*, *Cat*, *HO-1*, *Gpx1* and *Gclc*) was also evaluated. The results show that RC513 increased the expression of *Gpx1*, *Prdx2* and *Prdx5*, while (PhSe)₂ increased expression of the *Gpx1*, *Cat*, *HO-1* and *Gclc*. These results suggest that both compounds activate the Nrf2 and/or FoxO signaling pathways in these cells. Both compounds were able to protect HT22 cells against the oxidative stress induced by tBuOOH. The cytoprotection mediated by the compounds was accompanied by the ability to both reduce the generation of oxidants and to prevent mitochondrial dysfunction. Pretreatment of the cells with both compounds increased the activity of GPx and the transcript levels of the *Gpx1* gene. Some distinct effects were verified, such as (PhSe)₂ in addition to increasing GPx activity, this compound positively modulated *Gclc* transcripts correlating with the increase of GSH and NPSH levels in HT22 cells, while RC513 did not induced changes in these parameters. Additionally, we evaluated the effect of (PhSe)₂ and RC513 (0.5 μM and 2 μM) on cytotoxicity induced by other stressors (SIN-1, glutamate and MeHg). The results indicated that pre-treatment with (PhSe)₂ or RC513 (2 μM) prevented the decrease in cell viability after exposure to tBuOOH

(400 μM), SIN-1 (2 mM), glutamate (10 mM) and MeHg (1000 nM). A short pretreatment period with RC513 (2 μM , for 3 h) had a better protective efficiency than $(\text{PhSe})_2$ in maintaining cell viability after prolonged exposure to tBuOOH (40 μM). In addition, RC513 (0.5 μM) was more effective than $(\text{PhSe})_2$ on cytoprotection against tBuOOH (40 μM), glutamate (5 mM) and MeHg (1000 nM). In summary, this study demonstrates, for the first time, the protective effects of compounds $(\text{PhSe})_2$ and RC513 on HT22 neuronal cells exposed to oxidants, showing some differences in the mechanism of protection of these compounds. The results of the present study suggest and indicate that these compounds are promising as neuroprotective agents under conditions related to oxidative stress and mitochondrial dysfunction.

Keywords: Probucol derivatives, RC513, $(\text{PhSe})_2$, Glutathione peroxidase, Mitochondrial dysfunction, HT22 cells, tBuOOH.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Representação esquemática da fosforilação oxidativa (OXPHOS).....	2
Figura 2. Parâmetros respiratórios mitocondriais.....	4
Figura 3. Geração de espécies oxidantes durante a biossíntese de ATP na mitocôndria.....	6
Figura 4. Modulação da geração de oxidantes celulares.....	8
Figura 5. Ciclo catalítico da glutatona peroxidase.....	11
Figura 6. Vias redox envolvidos na manutenção de cofatores necessários para a atividade da GPx1.....	12
Figura 7. Regulação de Nrf2 por Keap1 em condições basais e de estresse.....	14
Figura 8. Compostos orgânicos de selênio e ciclo de atividade tiol-peroxidase.....	16
Figura 9. Mecanismo bioquímico envolvido no efeito protetivo do (PhSe) ₂	18
Figura 10. Composto inédito RC513.....	20
Figura 11. Mecanismo pelo qual o tBuOOH induz estresse oxidativo e toxicidade nas células.....	23
Figura 12. Resumo de materiais e métodos utilizados no presente estudo.....	30

Capítulo I: A MODULAÇÃO DO SISTEMA ANTIOXIDANTE DA GLUTATIONA ESTÁ IMPLICADA NO EFEITO PROTETOR DO DISSELENETO DE DIFENILA CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO E DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL EM CÉLULAS NEURONAIS

Figura 1.1. Toxicidade induzida por tBuOOH em células HT22.....	43
Figura 1.2. (PhSe) ₂ protege as células contra a toxicidade mediada por tBuOOH.....	45
Figura 1.3. (PhSe) ₂ previne a geração de EO induzida por tBuOOH.....	46
Figura 1.4. (PhSe) ₂ previne a disfunção mitocondrial induzida por tBuOOH nas células HT22.....	48
Figura 1.5. (PhSe) ₂ modula o sistema antioxidante da glutatona em células HT22.....	50
Figura 1.6. A inibição da atividade GPx reduz o efeito citoprotetor de (PhSe) ₂	51

Capítulo II: AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOPROTETOR DE UM COMPOSTO INÉDITO DERIVADO DE PROBUCOL: MODULAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM CÉLULAS NEURONAIS

Figura. 2.1. Efeitos dependentes da concentração e do tempo de exposição ao tBuOOH sobre a viabilidade celular de células HT22.....	55
Figura 2.2. Efeitos do RC513 contra a toxicidade induzida por tBuOOH em células HT22.....	56
Figura 2.3. Efeitos protetores do RC513 contra a geração de EO induzida por tBuOOH.....	57
Figura 2.4. Efeito do RC513 nas taxas de consumo de oxigênio (OCR) nas células HT22.....	59
Figura 2.5. Efeito de RC513 no sistema de defesa antioxidante dependente de glutatona	60
Figura 2.6. A inibição da glutatona peroxidase reduz a proteção induzida por RC513 em células HT22 expostas a tBuOOH.....	62

Capítulo III: ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO PROTECTOR DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO (PhSe)₂ E RC513 EM CÉLULAS NEURONAIS HT22 EXPOSTAS AO tBuOOH E/OU MeHg.

Figura 3.1. Efeito temporal do (PhSe) ₂ e RC513 na expressão gênica da GPx1, GPx4 e atividade da GPx em células HT22.....	65
Figura. 3.2. Efeito protetor do (PhSe) ₂ e RC513 na viabilidade das células HT22 expostas ao tBuOOH ou SIN-1.....	67
Figura 3.3. Efeito diferencial do (PhSe) ₂ e RC513 sobre os níveis de NPSH, GSH, e na expressão temporal do gene <i>Gclc</i> em células HT22.....	68
Figura 3.4. Efeito do (PhSe) ₂ e RC513 sobre a expressão gênica temporal de enzimas antioxidantes em células HT22.....	70
Figura. 3.5. Efeito temporal do pré-tratamento com (PhSe) ₂ e RC513 sobre a viabilidade das células HT22 expostas ao tBuOOH.....	71
Figura 3.6. Efeito diferencial do (PhSe) ₂ e RC513, dependente da concentração, sobre a viabilidade celular e atividade GPx em células HT22.....	73
Figura 3.7. Efeito protetor diferencial do (PhSe) ₂ e RC513 em células HT22 expostas a glutamato.....	74
Figura 3.8. Caracterização da toxicidade de MeHg em células HT22.....	76

Figura 3.9. Efeito protetor diferencial do (PhSe) ₂ e RC513 em células HT22 expostas ao MeHg.....	78
Figura 3.10. Inibição da atividade GPx por MeHg em células HT22.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características estruturais e substratos comprovados para GPx de vertebrados.....	10
Tabela 2. Efeitos citotóxicos do tBuOOH em diferentes células e tecidos.....	21
Tabela 3. Sequências de iniciadores de genes usados nos experimentos de RT-qPCR.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta\psi_m$	potencial de membrana mitocondrial
A β	proteína beta Amiloide
ANOVA	análise de variância
ATP	adenosina trifosfato
A.U.C	área sob a curva
Cat	catalase
CTE	cadeia transportadora de elétron
H ₂ DCFDA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
DMEM	médio Eagle modificado de Dulbecco
DNAmt	ácido desoxirribonucleico mitocondrial
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	erro padrão da média
EO	espécie oxidante (inclui as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio)
FOXO	fator de transcrição Forkhead box
SFB	soro fetal bovino
FCCP	do inglês <i>carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone</i>
Gapdh	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GCL	glutamato cisteína ligase
GPx	glutathione peroxidase
GR	glutathione reductase
GSH	glutathione reduzida
GSSG	glutathione oxidada
G6PD	glucose-6-fosfato desidrogenase
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HBSS	tampão solução balanceada salina de Hank
HO-1	heme oxigenase 1
IP	iodeto de propídeo
Keap1	proteína 1 associada à proteína epícloridrina tipo 1
MeHg	metilmercúrio
MnSOD	manganes superóxido dismutase
MS	ácido mercaptosuccínico
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium
NADPH	dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina reduzida
NADP+	dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina oxidada

NPSH	tióis não proteicos (do inglês <i>non-protein sulfhydryl</i>)
NO	óxido nítrico
NOX	NADPH oxidases
Nrf2	fator eritróide nuclear relacionado com o fator 2
OCR	taxa do consumo de oxigênio (do inglês <i>oxygen consumption rate</i>)
OH·	radical hidroxila
O ₂ · ⁻	radical ânion superóxido
ONOO·	peroxinitrito
OXPPOS	fosforilação oxidativa
PB	probucof
PBS	tampão fosfato salina
(PhSe) ₂	disseleneto de difenila
Prdx	peroxirredoxina
RC513	composto orgânico de selênio derivado do probucof
RNA	ácido ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>)
RT-qPCR	transcriptase reversa - PCR tempo real (do inglês <i>Reverse transcriptase Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i>)
-Se-OH	ácido selenenico
SDS	dodecil sulfato de sódio
SIN-1	1,3- morpholinosydnonimine
SOD	superóxido dismutase
tBuOOH	hidroperóxido de terc-butila
Txn	tiorredoxina
Txnrd	tiorredoxina redutase
<i>Txnrd2</i>	gene que codifica tiorredoxina redutase 2
TS	sistema da tiorredoxina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1.1 PARÂMETROS RESPIRATÓRIOS MITOCONDRIAIS	3
1.2. OXIDANTES BIOLÓGICOS E SISTEMA ANTIOXIDANTE	5
1.2.1. Glutationa peroxidase (GPx).....	8
1.2.1.1. Mecanismo enzimático da Glutationa Peroxidase.....	9
1.2.2. Peroxirredoxinas	12
1.2.3. Tiorredoxina/ tiorredoxina redutase	12
1.3. MODULAÇÃO DE DEFESAS ANTIOXIDANTES POR FATORES DE TRANSCRIÇÃO (Nrf2 e FoxO).	13
1.4. COMPOSTOS ANTIOXIDANTES E A NEURODEGENERAÇÃO.....	15
1.4.1. COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO.....	15
1.4.2. DISSELENETO DE DIFENILA (PhSe) ₂	17
1.4.3. COMPOSTOS DERIVADOS DO PROBUCOL.....	18
1.5. MODELO DE ESTRESE OXIDATIVO <i>IN VITRO</i> INDUZIDO POR tBuOOH.....	20
2. HIPÓTESE.....	27
3. OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL:.....	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	27
4. ORGANIZAÇÃO DA TESE.....	29
.....	30
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
5.1. COMPOSTO DISSELENETO DE DIFENILA (PhSe) ₂	31
5.2. COMPOSTO RC513	31
5.3. CULTURA CELULAR DE NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS HT22	31
5.4. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR	31
5.5. DETERMINAÇÃO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES OXIDANTES (EO)	33
5.6. DETERMINAÇÃO DE TIÓIS NÃO PROTEICOS (NPSH) E DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)	34
5.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE	35
5.8. OXIMETRIA DE ALTA RESOLUÇÃO	36

5.9. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRITOS DE GENES ENVOLVIDOS COM O SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	37
5.9.1. Extração de RNA total e sínteses de cDNA.....	37
5.9.2. RT-qPCR.....	38
5.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
6. Capítulo I:	41
A MODULAÇÃO DO SISTEMA ANTIOXIDANTE DA GLUTATIONA ESTÁ IMPLICADA NO EFEITO PROTETOR DO DISSELENETO DE DIFENILA CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO E DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL EM CÉLULAS NEURONAIS.....	41
1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
1.2. RESULTADOS.....	42
1.2.1. tBuOOH INDUZ TOXICIDADE EM CÉLULAS HT22.....	42
1.2.2. (PhSe) ₂ PROTEGE AS CÉLULAS NEURONAIS HT22 CONTRA A TOXICIDADE MEDIADA POR tBuOOH.....	44
1.2.3. (PhSe) ₂ PREVINE A GERAÇÃO DE ESPÉCIES OXIDANTES INDUZIDAS POR tBuOOH EM CÉLULAS HT22.....	44
1.2.4. (PhSe) ₂ PREVINE A DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL INDUZIDA POR tBuOOH EM CÉLULAS HT22.....	47
1.2.5. (PhSe) ₂ MODULA O SISTEMA ANTIOXIDANTE DA GLUTATIONA EM CÉLULAS HT22.....	47
1.2.6. O EFEITO PROTETOR DO (PhSe) ₂ ENVOLVE A MODULAÇÃO DA ATIVIDADE GPx.....	49
8. Capítulo II:.....	53
AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOPROTETOR DE UM COMPOSTO INÉDITO DERIVADO DE PROBUCOL: MODULAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM CÉLULAS NEURONAIS.....	53
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
2.2. RESULTADOS.....	54
2.2.1. EFEITO DO RC513 EM CÉLULAS HT22 EXPOSTAS AO tBuOOH.....	54
2.2.2. EFEITO DO RC513 SOBRE A GERAÇÃO DE ESPÉCIES OXIDATIVAS INDUZIDA POR tBuOOH EM CÉLULAS HT22.....	54

2.2.3. EFEITO DO RC513 SOBRE A FUNÇÃO MITOCONDRIAL DE CÉLULAS HT22 EXPOSTAS AO tBuOOH	58
2.2.4. EFEITO DO RC513 SOBRE A ATIVIDADE E EXPRESSÃO DE RNAm DA GPx, E SOBRE OS NÍVEIS DE NPSH NAS CÉLULAS HT22.....	58
2.2.5. O ÁCIDO MERCAPTOSUCCÍNICO (MS) REDUZ O EFEITO PROTETOR DE RC513 EM CÉLULAS HT22	61
8. Capítulo III:	63
ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO PROTETOR DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO (PhSe)₂ E RC513 EM CÉLULAS NEURONAIAS HT22 EXPOSTAS À OXIDANTES.....	63
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	63
3.2. RESULTADOS	64
3.2.1. MODULAÇÃO POSITIVA TEMPO-DEPENDENTE DA ATIVIDADE GPx E DA EXPRESSÃO GÊNICA DA GPx1 APÓS TRATAMENTO COM (PhSe) ₂ E RC513	64
3.2.2. RC513 e (PhSe) ₂ PROTEGEM AS CÉLULAS HT22 DESAFIADAS COM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE tBuOOH.	66
3.2.3. (PhSe) ₂ AUMENTA OS NÍVEIS DE GSH, NPSH E TRANSCRITOS DE <i>Gclc</i> NAS CÉLULAS HT22, EM CONTRASTE AO RC513.....	66
3.2.4. NÍVEIS DE TRANSCRITOS DE GENES DE OUTRAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM CÉLULAS HT22 PRÉ-TRATADAS COM OS COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO	69
3.2.5. EFEITO DIFERENCIAL NO TEMPO DE PRÉ-TRATAMENTO COM OS COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO SOBRE A VIABILIDADE CELULAR EM CÉLULAS HT22 EXPOSTAS AO tBuOOH.....	69
3.2.6. EFEITO PROTETOR DIFERENCIAL NAS CÉLULAS HT22 DEPENDENTE DA CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO	71
3.2.7. EFEITO PROTETOR DIFERENCIAL DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO EM CÉLULAS EXPOSTAS A GLUTAMATO.....	72

3.2.8. COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO PROTEGEM DIFERENCIALMENTE CONTRA A TOXICIDADE INDUZIDA POR MeHg EM CÉLULAS HT22.....	75
3.2.9. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE GPX MEDIADA POR MeHg EM CÉLULAS HT22.....	77
9. DISCUSSÃO GERAL.....	81
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO.....	93
11. PERSPECTIVAS	95
12. REFERÊNCIAS	97
13. APÊNDICE.....	117

INTRODUÇÃO

A população mundial cresceu rapidamente nos últimos anos, atingindo 7,3 bilhões de indivíduos no ano de 2015, e cerca de 617 milhões (8,5%) destes indivíduos têm 65 anos ou mais. Os Estados Unidos e a Europa foram consideradas regiões com as populações mais idosas, mas, nos últimos anos o envelhecimento populacional na Ásia e a América Latina cresceu substancialmente. Entre os anos de 2025 a 2050, estima-se que o número de pessoas idosas será de aproximadamente 1,6 bilhões (16,7%), enquanto que a população total crescerá 34% durante o mesmo período (HE; GOODKIND; KOWAL, 2016). Apesar dessas melhorias na expectativa de vida, as condições neurodegenerativas têm se tornado doenças de alto índice prevalente. Além disso, o estresse psicológico como o medo de adquirir estas doenças, é um fato relevante que contrapõe o bem estar dos idosos (WYSS-CORAY, 2016).

As doenças neurodegenerativas apresentam etiologias heterogêneas e são caracterizadas pelo progressivo dano em células neuronais, resultando na perda anatômica seletiva de sistemas neurais fisiologicamente relacionados a diferentes regiões do cérebro, como o córtex e hipocampo (KIM et al., 2015; Liu et al., 2017). Cabe ressaltar que o dano neuronal no hipocampo está relacionado com vários tipos de demência, especialmente com a doença de Alzheimer (JACK et al., 1998; PENG et al., 2014). As doenças neurodegenerativas diferem amplamente em patogênese e sintomas. Embora sua etiologia não esteja totalmente elucidada, evidências experimentais e clínicas sugerem que o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial são fatores comuns na patogênese de várias destas doenças, incluindo a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose amiotrófica lateral e doença de Huntington (BOZZO; MIRRA; CARRÌ, 2017; GANGULY et al., 2017; LIU et al., 2017). O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre o balaço da geração de espécies oxidantes (EO) e defesas antioxidante em favor dos formadores ou situações oxidantes. Assim, devemos ter em consideração que o estresse oxidativo apresenta dois lados: enquanto o excessivo desafio oxidante causa danos às biomoléculas, a manutenção de um nível fisiológico de desafio oxidante, denominado “eustress oxidativo”, é essencial para governar os processos da vida através de sinalização redox (SIES; JONES, 2007; BARBOSA et al., 2010; SIES, 2015; SIES; BERNDT; JONES, 2017). Uma organela particularmente envolvida neste processo é a mitocôndria.

Para definir a disfunção mitocondrial, cabe ressaltar a importância da função das mitocôndrias dentro da célula, entre elas a

geração de ATP por fosforilação oxidativa (OXPHOS) (Fig. 1). Outras funções atribuídas às mitocôndrias são a geração e detoxificação de EO, envolvimento na apoptose e regulação na concentração Ca^{2+} intracelular (BRAND; NICHOLLS, 2011).

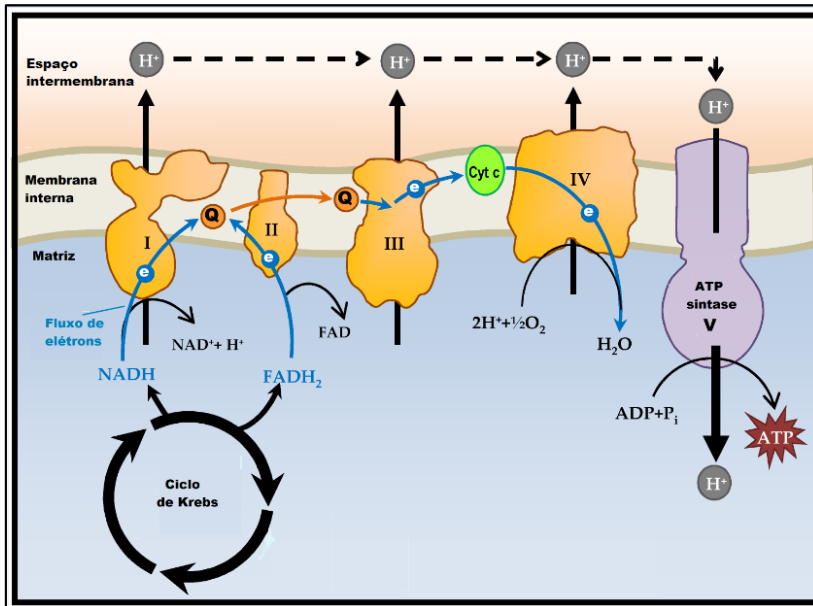


Figura 1. Representação esquemática da fosforilação oxidativa (OXPHOS).

A fosforilação oxidativa é uma via metabólica que as células usam para oxidar nutrientes, liberando energia na forma de ATP. Esta via é formada pelos complexos I-IV, chamada também de cadeia transportadora de elétrons (CTE), e o complexo V, uma ATP sintase. O complexo I oxida o NADH ou o complexo II oxida o FADH_2 , os elétrons doados reduzem à coenzima Q, passando esta de sua forma ubiquinona para ubiquinol. Os elétrons então fluem da coenzima Q para o Complexo III, este oxida o ubiquinol e doa os elétrons ao citocromo c. O complexo IV é responsável pela reação enzimática terminal da CTE que transfere elétrons (e^-) para o oxigênio molecular (O_2) formando água. Os elétrons passam por esses complexos em uma série de reações de oxidação-redução, e a energia liberada por essa CTE é usada para bombear prótons da matriz mitocondrial para o espaço inter-membrana através dos Complexos I, III e IV, criando o gradiente eletroquímico, permitindo que os prótons voltem para a matriz através do complexo V, usando a energia liberada para catalisar a síntese de ATP a partir de ADP e fosfato. Figura adaptada de Yusoff et al. (2015).

As diversas funções das mitocôndrias, em diferentes processos celulares, e a existência de vários métodos para examinar a função mitocondrial levaram a variações na definição de disfunção mitocondrial. Nesse sentido, alguns grupos referem-se à disfunção mitocondrial como diminuição do conteúdo mitocondrial, outros referem-se à diminuição da atividade mitocondrial e à fosforilação oxidativa, enquanto outros enfocam aspectos diferentes, como a geração de espécies oxidantes. Outros investigadores, ainda, usam o termo para referir-se à uma diminuição da oxidação de substratos na mitocôndria, incluindo lipídios e carboidratos, resultante de uma diminuição geral no sistema OXPHOS (MONTGOMERY; TURNER, 2014). Portanto, a disfunção mitocondrial pode ser definida como alguma anormalidade na função da mitocôndria (BRAND; NICHOLLS, 2011). Cabe mencionar a importância do ATP para muitos processos celulares e portanto a função mitocondrial (e disfunção mitocondrial) desempenha um papel essencial na saúde metabólica e destino celular (MONTGOMERY; TURNER, 2014).

1.1 PARÂMETROS RESPIRATÓRIOS MITOCONDRIAIS

Tem-se buscado nos últimos anos o aperfeiçoamento de técnicas que permitam avaliar a função mitocondrial e a bioenergética celular. A avaliação do consumo de oxigênio em células intactas oferece vantagem de relevância fisiológica, já que evita que possíveis artefatos associados ao isolamento mitocondrial ou à permeabilidade celular interfiram com os resultados. Uma dessas técnicas é a respirometria de alta resolução a qual permite quantificar vários parâmetros mitocondriais como a taxa de consumo de oxigênio (OCR) basal, OCR ligado à síntese de ATP, vazamento de prótons, capacidade respiratória máxima e capacidade de reserva respiratória mitocondrial (Fig. 2). Há variabilidade nos diversos parâmetros mitocondriais dependendo do tipo celular avaliado (*i*) OCR basal ou a respiração basal é controlado pela oxidação do substrato endógeno no meio de cultura e pode ser alterado dependendo da presença ou ausência de diferentes substratos e hormônios no meio de incubação; (*ii*) OCR ligado à síntese de ATP pode ser estimada a partir da respiração basal subtraída da respiração após a inibição da ATP sintase com oligomicina; (*iii*) A capacidade respiratória máxima causada pela adição de um desacoplador da CTE como o FCCP, reflete a atividade máxima de transporte de elétrons e oxidação do substrato que são alcançáveis pelas células nas condições de ensaio. Uma diminuição da capacidade respiratória máxima é um forte indicador da disfunção mitocondrial; (*iv*)

Capacidade de reserva mitocondrial, é a capacidade de reversa respiratória responsiva a condições de uma demanda energética variável. Isto é medido pela diferença entre a capacidade respiratória máxima e a respiração basal (BRAND; NICHOLLS, 2011).

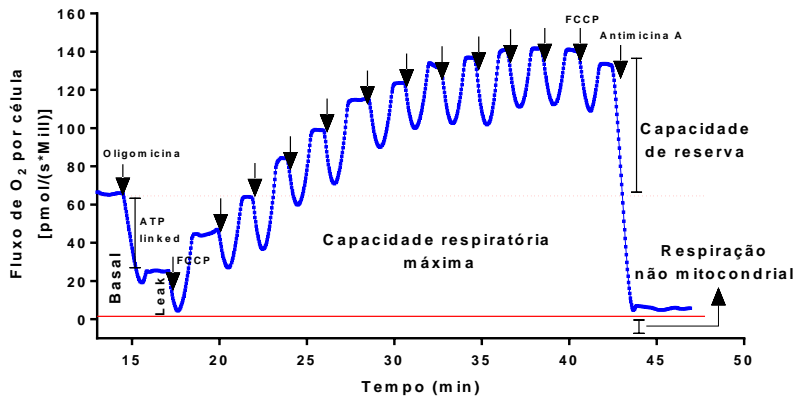


Figura 2. Parâmetros respiratórios mitocondriais. Resumidamente, a medida da função mitocondrial envolve três etapas. No passo 1, após a medição da OCR basal, é adicionada oligomicina (um inibidor da ATP sintase mitocondrial). A diminuição do OCR resultante deste tratamento é atribuída ao oxigênio utilizado para gerar ATP (ATP linked). No passo 2, adiciona-se o ionóforo de prótons FCCP, o qual desacopla a transferência de elétrons (que ocorre na CTE) da síntese de ATP e permite o fluxo de elétrons sem restrições através da CTE, levando a um aumento na OCR (capacidade respiratória máxima). No passo 3, o inibidor do complexo III, antimicina A, é adicionado para determinar o consumo de oxigênio independente da CTE (respiração não mitocondrial).

As células do sistema nervoso central, como os neurônios e os astrócitos, têm alta demanda energética e são responsáveis pelo maior consumo de oxigênio e glicose no cérebro, representando mais de 20% do consumo de oxigênio total do corpo (GANDHI; ABRAMOV, 2012). Por exemplo, no cérebro humano um neurônio cortical utiliza aproximadamente 4,7 bilhões de moléculas de ATP por segundo para realizar suas funções biológicas, como a formação de sinapses, geração do potencial de ação e a transmissão sináptica (ZHU et al., 2012). Embora o oxigênio seja fundamental para a vida em geral, cabe mencionar que o cérebro é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo, devido a vários fatores que promovem a grande formação de oxidantes em

comparação com outros órgãos. Esta susceptibilidade se explica não somente pela sua alta taxa metabólica, mas também pelos baixos níveis e baixa atividade de algumas enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase, e a glutatona peroxidase (GPx) (FRIEDMAN, 2011; FERNANDEZ-FERNANDEZ; ALMEIDA; BOLAÑOS, 2012), e pela presença de níveis elevados de ferro em algumas regiões do cérebro, que favorecem a reação de Fenton (explicada mais adiante). Além disso, como o cérebro é rico em ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), a peroxidação lipídica é o tipo proeminente de dano oxidativo (COYLE; PUTTFARCKEN, 1993). Em condições fisiológicas normais, cerca de 1-2% de O_2 consumido é convertido em EO, mas essa porcentagem pode aumentar consideravelmente as condições neurodegenerativas em decorrência da redução das defesas antioxidantes e baixa capacidade regenerativa do cérebro envelhecido (UTTARA et al., 2009).

1.2. OXIDANTES BIOLÓGICOS E SISTEMA ANTIOXIDANTE

Nas células de mamíferos, o sistema OXPHOS é a principal fonte de ATP, essencial para a vida. No entanto, durante o processo de síntese energética, um pequeno número de elétrons vaza (*leak*) e pode reagir rapidamente com o oxigênio, formando o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o qual podemos dizer que é uma EO primária, porque ao reagir com outras moléculas da origem a outras EO, por exemplo, pode reagir com óxido nítrico (NO^{\cdot}) e gerar peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) (VALKO et al., 2007). Para a neutralização dos oxidantes produzidos rotineiramente no processo oxidativo, as células, incluindo as cerebrais, possuem um complexo sistema de defesa antioxidante, composto pelo sistema dependente de glutatona, o sistema tioredoxina/peroxirredoxina, as superóxido dismutases e a catalase (BAXTER; HARDINGHAM, 2016).

A produção de $O_2^{\cdot-}$ ocorre principalmente nos complexos mitocondriais I e III da CTE (Fig. 3). O complexo I produz $O_2^{\cdot-}$ no lado da matriz mitocondrial, enquanto o complexo III libera $O_2^{\cdot-}$ na matriz e no espaço intermembrana (VALKO et al., 2007; BOLAÑOS et al., 2009). O $O_2^{\cdot-}$ oxida diretamente os centros ferro-enxofre (Fe-S) de enzimas, liberando Fe^{+2} e causando sua inibição. Um exemplo é a oxidação e consequente inativação da aconitase, importante enzima do ciclo de Krebs (FLINT; TUMINELLO; EMPTAGE, 1993). Como mencionado anteriormente, o $O_2^{\cdot-}$ pode reagir também com o NO^{\cdot} , produzindo $ONOO^{\cdot-}$, uma EO de nitrogênio altamente difusível e tóxica que facilmente oxida e danifica os diversos constituintes celulares em particular as enzimas

mitocondriais (FREEMAN et al., 2008). Por outro lado, o O_2^- pode ser dismutado a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase (Mn-SOD na matriz mitocondrial ou Cu/Zn-SOD no citosol) (MAILLOUX; MCBRIDE; HARPER, 2013), este H_2O_2 pode ser reduzido a água por peroxidases. O H_2O_2 tem uma vida útil mais longa do que o O_2^- e é uma molécula altamente difusível podendo permear com facilidade as membranas celulares (BIENERT et al., 2007).

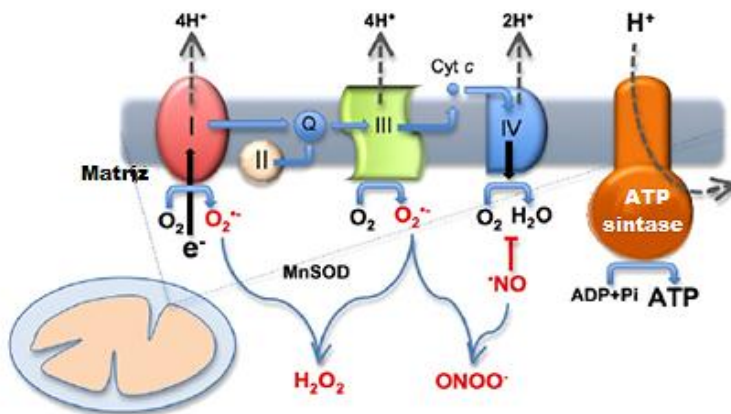


Figura 3. Geração de espécies oxidantes durante a biossíntese de ATP na mitocôndria. Cadeia transportadora de elétrons (CTE - Complexos I, II, III e IV) transfere elétrons de substratos reduzidos para o O_2 . Durante a transferência de elétrons, ocorre o bombeamento de prótons para o espaço intermembrana gerando o gradiente eletroquímico, o qual é conservado para a fosforilação do ADP pela ATP sintase. Mesmo em condições fisiológicas pode ocorrer a transferência de um elétron para o O_2 no complexo I e III, formando o ânion superóxido (O_2^-), o qual pode ser dismutado a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima MnSOD ou pode reagir com óxido nítrico (NO^\bullet) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$). Figura adaptada de Bolaños et al. (2009).

A remoção enzimática do H_2O_2 evita a formação do radical hidroxila (OH^\bullet), o qual é altamente reativo e prejudicial. Este OH^\bullet é associado a mutações irreparáveis, como as deleções no DNA mitocondrial (DNAm), o que por sua vez induz progressiva disfunção na CTE comprometendo as funções da mitocôndria, como a produção de ATP via OXPHOS e gerando um aumento de EO (SHOKOLENKO et al., 2009; ISLAM, 2017). O OH^\bullet pode ainda ser formado pela redução de metais de transição como o Fe^{2+} (Reação de Fenton). Intracelularmente,

a reação de Fenton é limitada, em parte pela indisponibilidade de metais de transição livres nas células, mas pode desempenhar um papel importante em condições de estresse oxidativo que envolvem acúmulo de altos níveis de H_2O_2 intracelular e liberação de Fe^{2+} a partir de locais de armazenamento intracelulares (PERRON; BRUMAGHIM, 2009; LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2011). Por outro lado, baixos níveis de H_2O_2 desempenham um importante papel na sinalização celular servindo como segundo mensageiro na transdução de sinal (SENA; CHANDEL, 2012).

O excesso de H_2O_2 gerado pode permear as membranas e ser degradado pela catalase, presente nos peroxissomos e mitocôndrias, bem como pela glutatona peroxidase (GPx) e peroxirredoxinas (Prdx) tanto na mitocôndria como no citoplasma (Fig. 4). A remoção de H_2O_2 pelas GPx e Prdx forma glutatona oxidada (GSSG) e tiorredoxina (Txn) oxidada, que podem ser posteriormente reduzidas pela glutatona redutase (GR) e tiorredoxina redutase (Txnrd), às custas do poder redutor do NADPH (SENA; CHANDEL, 2012). Assim, a glutatona (GSH) e indiretamente NADPH são moléculas indispensáveis aos processos enzimáticos responsáveis pelo equilíbrio redox. A GSH é um tri-peptídeo sintetizado pela glutamato cisteína ligase (GCL) e GSH-sintetase (DRINGEN, 2000; LU, 2014). Embora a GSH seja utilizada como um cofator importante na função das enzimas antioxidantes, ela também é considerada uma molécula redutora *per se* no cérebro (DRINGEN, 2000) e representa 90% dos tióis não proteicos celulares (NPSH), importantes para determinar o estado redox celular (MUSTAFA, 1985).

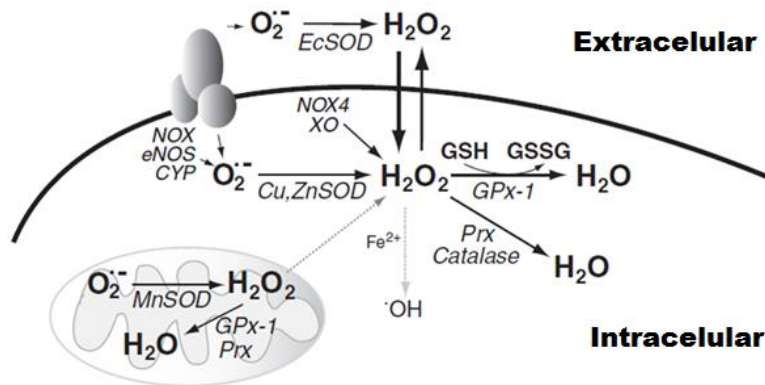


Figura 4. Modulação da geração de espécies oxidantes celulares. O $O_2^{\cdot-}$ origina-se da respiração mitocondrial normal ou de fontes enzimáticas, como as NADPH oxidases (NOX), a óxido nítrico sintase endotelial desacoplada (eNOS), ou as isoformas do citocromo P-450 (CYP). O $O_2^{\cdot-}$ é dismutado enzimaticamente a H_2O_2 pela superóxido dismutase extracelular (ECsOD), cobre/zinco intracelular (Cu,ZnSOD) ou a manganês (MnSOD) localizada na mitocôndria. O H_2O_2 também pode ser produzido diretamente pela xantina oxidase e NADPH oxidase subtipo 4. Sob certas condições de estresse oxidativo, como a isquemia-reperfusão, o H_2O_2 pode reagir com o Fe^{2+} livre para promover a formação do OH^{\cdot} . Sob condições celulares normais, a quantidade de Fe^{2+} livre na célula é baixa, limitando o fluxo através dessa via (ilustrada por cinza claro). O H_2O_2 é subsequentemente reduzido enzimaticamente pelas glutations peroxidases (GPxs), incluindo GPx1, assim como pela catalase e peroxirredoxinas (Prdxs). A catalase encontra-se principalmente nos peroxissomos, enquanto algumas isoformas de Prdxs localizam-se nas mitocôndrias (por exemplo, Prdx 3,5) ou no citosol (como Prdx 1,2). A maioria das Prdxs utiliza Txn como fonte de equivalentes redutores, embora a Prx 6 pareça funcionar como uma peroxidase dependente de GSH. É importante ressaltar que o GPx1 pode ser encontrado no citosol e na matriz mitocondrial. A GPx1 utiliza o GSH como cofator para reduzir o H_2O_2 , resultando na formação de glutationa oxidada (GSSG). Para simplificar, peroxissomos, Txn e GSH mitocondrial, não estão representados nesta figura. Figura adaptada de Lubos et al. (2011).

1.2.1. Glutaciona peroxidase (GPx)

A glutaciona peroxidase (GPx) é uma família de peroxidases que catalisam a redução de H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos (Tabela 1) à água e álcool, respectivamente, utilizando os equivalentes redutores da GSH e

por conseguinte desempenham um papel chave no controle do estresse oxidativo no cérebro (POWER; BLUMBERGS, 2009). As isoenzimas GPx1 a GPx4 possuem uma selenocisteína no seu sítio catalítico a qual garante rápida eficiência de reação com peróxidos (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013). Além disso, a GPx1 também pode atuar como uma redutase do potente agente nitroxidante ONOO⁻ (SIES et al., 1997). A GPx1 é expressa ubiquamente no citosol e na matriz mitocondrial (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013), e está presente tanto nos neurônios quanto nas células gliais (TRÉPANIÉ et al., 1996), enquanto a GPx4 não está presente em células gliais (SAVASKAN et al., 2007). A GPx4 é uma enzima associada à membrana, onde catalisa a redução de peróxidos lipídicos complexos e a consequente diminuição da peroxidação lipídica sob condições neurotóxicas (WANG et al., 2003). A GPx4 apresenta 3 isoformas (citosólica, mitocondrial e nuclear), todas geradas a partir de um mesmo gene por *splicing* alternativo (SAVASKAN et al., 2007).

Cabe ressaltar que a família GPx tem função chave na detoxificação de peróxidos, e qualquer alteração destas enzimas pode potencialmente comprometer o equilíbrio redox celular e incrementar ou acelerar uma condição neurodegenerativa. Estudos mostraram uma diminuição *post-mortem* da atividade da GPx em cérebros de pacientes com doença de Parkinson (KISH; MORITO; HORNYKIEWICZ, 1985) ou sangue de pacientes com a doença de Alzheimer (MANOLOV, 2017). Evidências indicam que a GPx também pode estar envolvida em processos celulares responsáveis pela degradação enzimática de corpos de Lewy, característicos da doença de Parkinson (POWER; BLUMBERGS, 2009). Além disso, o incremento da atividade da enzima GPx culminou em neuroproteção em modelo experimental da doença de Huntington (MASON et al., 2013). Por outro lado, sua ausência aumentou o tamanho do infarto cerebral e a apoptoses em camundongos *knock-out* para GPx1 (*GPx1^{-/-}*) submetidos a isquemia-reperfusão (CRACK et al., 2001).

1.2.1.1. Mecanismo enzimático da Glutathione Peroxidase

A detoxificação de peróxidos e certos lipoperóxidos (Tabela 1) pelas GPxs de mamíferos ocorre por meio de um mecanismo enzimático do tipo *ping-pong* bi-substrato, no qual a cinética de saturação não é observada (Fig. 5). Esta detoxificação de peróxidos envolve a formação de várias modificações intermediárias estáveis no sítio ativo da enzima, particularmente na molécula de selenocisteína (Sec). O selenol (-Se⁻)

reage em forma de selenolato com o peróxido (ROOH) tornando-se oxidado a ácido selenênico (-SeOH). Neste momento, a primeira GSH reduz o -SeOH direcionando a formação do intermediário selenodissulfeto (-Se-SG), com a remoção de oxigênio em forma de H₂O. A segunda molécula de GSH reduz o -Se-SG por uma troca tiol-dissulfeto, no qual a GSSG é liberada e a enzima GPx regenerada para sua forma selenol, que agora está pronta para o seu próximo ciclo catalítico (LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2011; BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013).

Tabela 1. Características estruturais e substratos comprovados para GPx de vertebrados.

GPx tipo mamífero	Sítio ativo	Homo-tetrâmero	Substrato reduzido	Substrato oxidado
GPx1	Sec	Sim	GSH	H ₂ O ₂ LOOH solúvel ROOH ONOO ⁻
GPx2	Sec	Sim	n.d	n.d
GPx3	Sec	Sim	GSH	H ₂ O ₂ LOOH solúvel, ROOH, PLOOH
GPx4	Sec	Não	GSH, DTT, Mercaptoetanol, Cisteína,	H ₂ O ₂ , LOOH ROOH, PLOOH ChOOH, CEOOH ONOO ⁻
GPx6	Sec em humanos Cys em roedores	Sim	n.d	n.d

ChOOH, colesterol hidroperóxido; CEOOH, colesterol ester hidroperóxido; DTT, ditioneitol; LOOH, lipoperóxidos (Ac. Graxo); PLOOH, fosfatidil hidroperóxido de diferentes clases; ROOH pequenos hidroperóxidos sintéticos (p.e. Cumene hidroperóxido e tert-butyl-hidroperóxido); n.d não determinado. Tabela adaptada de Brigelius-Flohe e Maiorino (2013).

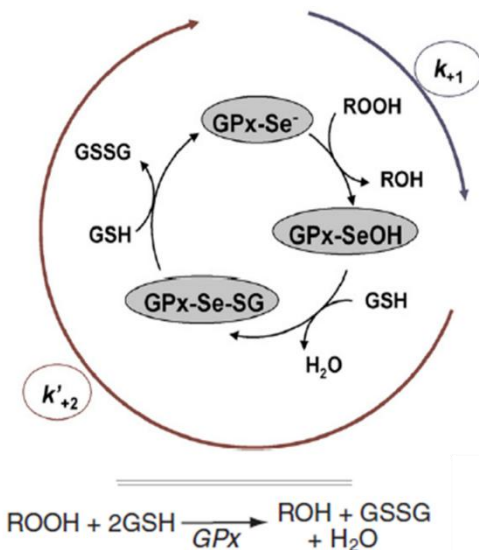


Figura 5. Ciclo catalítico da glutatona peroxidase. Este esquema básico foi avaliado para GPx1 e é válido também para as isoenzimas GPx3 e GPx4. Na parte de oxidação peroxidativa, o selenol (-Se⁻) torna-se oxidado em ácido selenênico (-Se-OH) pelo hidróperóxido (ROOH). Na parte redutora, a primeira GSH reduz o -Se-OH formando um intermediário selenodisulfeto (-Se-SG), o oxigênio é removido em forma de H₂O. A segunda molécula de GSH reduz o -Se-SG liberando GSSG e a enzima GPx é regenerada para sua forma -Se⁻ que agora está pronta para o próximo ciclo catalítico. A reação neta é mostrada na parte inferior da figura. Figura adaptada de Lubos et al. (2011) e Brigelius-Flohe e Maiorino (2013).

A resolução subsequente da GSSG envolve a ação da glutatona redutase (GR) dependente de NADPH; e a reciclagem de NADP⁺/NADPH é decorrente da ação da glicose-6-fosfato desidrogenase principalmente pela via das pentoses-fosfato (Fig. 6). Assim a GPx1 regula o estado de oxidação celular diretamente através da eliminação de hidróperóxidos via oxidação da GSH, o mais proeminente tiol de baixo peso molecular nas células (LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2011).

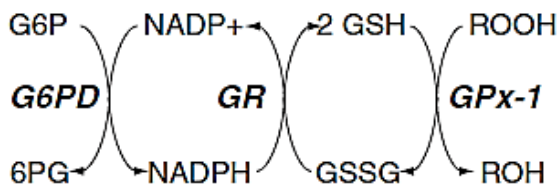


Figura 6. Vias redox envolvidos na manutenção de cofatores necessários para a atividade da GPx1. A GPx1 reduz o H_2O_2 e alguns lipoperóxidos às custas de GSH, a qual é oxidada para formar GSSG. A enzima glutaciona redutase (GR) recicla GSSG à GSH utilizando NADPH como fonte de equivalentes redutores, e a glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) mantém a reserva celular de NADPH. Figura adaptada de Lubos et al. (2011).

1.2.2. Peroxirredoxinas

Ao longo da última década, as peroxirredoxinas (Prdxs) despertaram um crescente interesse no campo dos antioxidantes. Atualmente, de acordo com a literatura, os mamíferos expressam seis isoformas de Prdxs (Prdx1-6). Pela presença de cisteínas no sítio ativo, as Prdxs podem reduzir diferentes tipos de peróxidos incluindo H_2O_2 , hidroperóxidos orgânicos e o $ONOO^-$ (TRUJILLO et al., 2007). Todas as isoformas estão presentes no citosol, as Prdx3 e Prdx5 são direcionadas às mitocôndrias e a Prdx5 também está presente nos peroxissomos. Finalmente, a Prdx4 é a única isoforma presente no retículo endoplasmático (para revisão, ver Rhee et al. 2005). Apesar de ter uma ampla distribuição, a sua expressão é muito baixa nos neurônios dopaminérgicos da substância nigra e nas células piramidais CA1/2 do hipocampo. Essa baixa expressão basal pode contribuir para a vulnerabilidade desses neurônios a ataques nitro-oxidativos que ocorrem na doença de Parkinson e na doença de Alzheimer (GOEMAERE; KNOOPS, 2012).

1.2.3. Tiorredoxina/ tiorredoxina redutase

O sistema de tiorredoxina (TS) consiste de um doador de elétrons (o NADPH) e dois tipos de proteínas oxidoreductase antioxidantes: a tiorredoxina (Txn) e a tiorredoxina redutase (Txnrd). A Txn possui um sítio ativo, Cys-Pro-Gly-Cys, que é essencial tanto para sua função como

uma oxidoreductase ativa quanto como doador de elétrons para algumas peroxirredoxinas (CHAE et al., 1999). A Txn é um importante regulador do equilíbrio redox na célula e tem sido implicado na sobrevivência celular em muitas condições, incluindo câncer e doenças neurodegenerativas (BURKE-GAFFNEY; CALLISTER; NAKAMURA, 2005). As células humanas contêm 3 diferentes tiorredoxinas (ARNÉR; HOLMGREN, 2000). A Txn1 é encontrada no citosol, Txn2 na mitocôndria, e uma terceira variante nos espermatozoides (Txn3). A Txnrd é um homodímero, que catalisa a redução do dissulfeto no local ativo da Txn. Existem três genes Txnrd distintos em mamíferos que codificam: a Txnrd citosólica (Txnrd1) e 2 Txnrd mitocondrial (Txnrd2 e Txnrd3). Além da Txn, as Txnrd podem diretamente reduzir outros substratos, tais como peróxidos (incluindo hidroperóxidos lipídicos e H_2O_2) (JORNSTEDT; KUMAR; HOLMGREN, 1995; ZHONG; ARNER; HOLMGREN, 2000), e a proteína dissulfeto isomerase (PDI), que participa no dobramento correto e no processamento de proteínas no retículo endoplasmático (LUNDSTROM; HOLMGREN, 1990). A Txnrd também atua como molécula antioxidante participando da regeneração de moléculas oxidadas, como dehidroascorbato (MAY et al., 1997; 1998), ácido lipóico (ARNÉR; NORDBERG; HOLMGREN, 1996) e ubiquinona (XIA et al., 2001).

1.3. MODULAÇÃO DE DEFESAS ANTIOXIDANTES POR FATORES DE TRANSCRIÇÃO (Nrf2 e FoxO).

A regulação da expressão gênica de proteínas envolvidas na defesa antioxidante via ativação de fatores de transcrição, sensíveis a oxidantes, é um componente importante da modulação de respostas celulares reativas às condições oxidativas (HADDAD, 2002). Nesta seção, mencionaremos somente dois dos mais estudados fatores de transcrição, o fator eritróide nuclear relacionado com o fator 2 (Nrf2) e o fator de transcrição *forkhead box* (FoxO), os quais estão relacionados com a ativação da expressão de genes antioxidantes.

O Nrf2 é um fator de transcrição que controla tanto a expressão basal de genes sob condições homeostáticas (não estresse), bem como a expressão de genes em condições de estresse (TEBAY et al., 2015). Como mostrado na Fig. 7, sob condições homeostáticas, a proteína Nrf2 recém-sintetizada tem vida curta, permanecendo sequestrada no citoplasma pela proteína Keap1. Periodicamente o complexo Nrf2-Keap1 é alvo de degradação proteossomal sendo reconhecido pelo complexo de proteínas CRL^{Keap1}. Sob tais circunstâncias, o Nrf2 é rapidamente submetido a

ubiquitinação e então degradado permanecendo livres os homodímeros Keap1 para sequestrar e processar o Nrf2 recém-traduzido. Uma pequena fração de Nrf2 escapa da degradação e transloca-se para o núcleo, mantendo um nível basal baixo de expressão de genes dirigidos por ARE (do inglês *Antioxidant Response Element*), mesmo sob circunstâncias homeostáticas normais. Sob condições de estresse, a modificação de Keap1 resulta em uma alteração conformacional que impede o complexo de proteínas CRL^{Keap1} ubiquitar Nrf2. Nesta situação, o Keap1 é incapaz de reconhecer e unir-se ao Nrf2, e como o Keap1 livre não pode ser regenerado, este é incapaz de unir-se ao Nrf2 recém-traduzido. Assim sob condições de estresse, Nrf2 recém-sintetizado evade a captura de Keap1 e transloca-se diretamente para o núcleo onde forma heterodímeros com proteínas sMaf e em conjunto ligam-se a sequências ARE para induzir a expressão de genes de enzimas antioxidantes como: Glutamato cisteína ligase (GCL), glutatona peroxidase 2 (GPx2), peroxirredoxina 1 (Prdx1), sulfiredoxina (Srxn1), tioredoxina 1 (Txn1), heme oxigenase 1 (HO-1) e glutatona-S-transferase (Gst)(MANN et al., 2009; TEBAY et al., 2015).

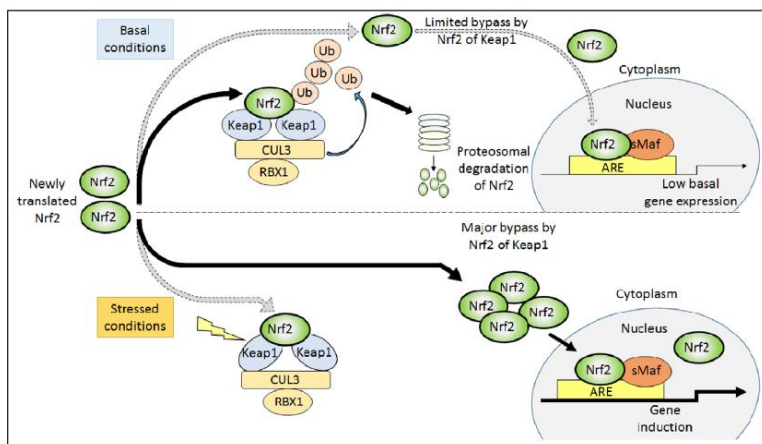


Figura 7. Regulação de Nrf2 por Keap1 em condições basais e de estresse (TEBAY et al., 2015).

Os fatores de transcrição da família FoxO estão envolvidos em vários processos celulares, incluindo proliferação, apoptose, metabolismo e são importantes reguladores da resposta celular ao estresse, promovendo a defesa antioxidante celular. Existem 4 membros da família FoxO conservados em mamíferos (FoxO1, FoxO3a, FoxO4 e FoxO6); FoxO1 e

FoxO3 são expressos em quase todos tecidos, FoxO4 é altamente expresso em músculo, rim e tecido colorretal enquanto FoxO6 é primariamente expresso no cérebro e no fígado (FEINBERG, 2013; WANG; ZHOU; GRAVES, 2014). As FoxOs estimulam a transcrição de genes codificadores para proteínas antioxidantes localizados em diferentes compartimentos subcelulares, como nas mitocôndrias (Superóxido dismutase-2, Peroxirredoxinas 3 e 5) e peroxissomos (catalase), bem como para proteínas antioxidantes encontradas extracelularmente no plasma (por exemplo, selenoproteína P) e possivelmente a GPx1 (KLOTZ et al., 2015). O co-ativador-1 α do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC-1 α) é regulador mestre de biogênese e função mitocondrial, e também um regulador de FoxO1 (FERNANDEZ-MARCOS; AUWERX, 2011).

1.4. COMPOSTOS ANTIOXIDANTES E A NEURODEGENERAÇÃO

Tendo em vista a variabilidade e abrangência dos danos celulares causados pelo estresse oxidativo nas células neurais, o estudo aprimorado de compostos com propriedades antioxidantes contribuirá para a melhoria das soluções terapêuticas propostas para o tratamento e prevenção das doenças neurodegenerativas (JIN et al., 2014; SANDHIR et al., 2015; RUAN et al., 2017). Os antioxidantes são classificados como compostos exógenos (naturais ou sintéticos) ou endógenos que atuam na remoção de oxidantes ou seus precursores, inibindo diferentes formas de oxidações biológicas, as quais podem causar o comprometimento de diversas funções celulares (GILGUN-SHERKI; MELAMED; OFFEN, 2001). Cabe ressaltar que alguns compostos antioxidantes como acetilcisteína, selenito de sódio, vitamina E (α -tocoferol), vitamina D, ácido lipoico, coenzima Q10 entre outros estão sendo estudados mostrando ter potenciais efeitos protetores frente a condições associadas com a doença de Alzheimer (DI DOMENICO et al., 2015) e Parkinson (DE RIJK et al., 1997).

1.4.1. COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO

Dentre os compostos com propriedades antioxidantes, o interesse pelos compostos orgânicos de selênio ressurgiu quando foi demonstrado que o ebselen (Fig. 8A), protótipo desta classe de compostos, apresentou propriedades protetoras em modelos de isquemia focal em ratos (DAWSON et al., 1995) e terapêuticas no tratamento da isquemia aguda em humanos (YAMAGUCHI et al., 1998). O estudo das propriedades

farmacológicas do disseleneto de difenila (PhSe)₂ (Fig. 8B) surgiu devido a sua relativa facilidade de síntese e estabilidade e por apresentar atividade tiol-peroxidase cerca de duas vezes maior do que a apresentada pelo ebselen (BARBOSA et al., 2017). Os disselenetos mimetizam o ciclo catalítico da GPx por um mecanismo de redução mediado por moléculas contendo grupos tiol, por exemplo GSH. Isso leva à formação de um intermediário selenol que é capaz de reduzir o peróxido com a formação concomitante de ácido selenênico, este é regenerado de volta a sua forma selenol por redução com GSH (Fig. 8C).

Neste cenário, vários compostos orgânicos de selênio foram sintetizados e estudados ao longo das últimas duas décadas com o objetivo de mimetizar a atividade peroxidase da enzima GPx.

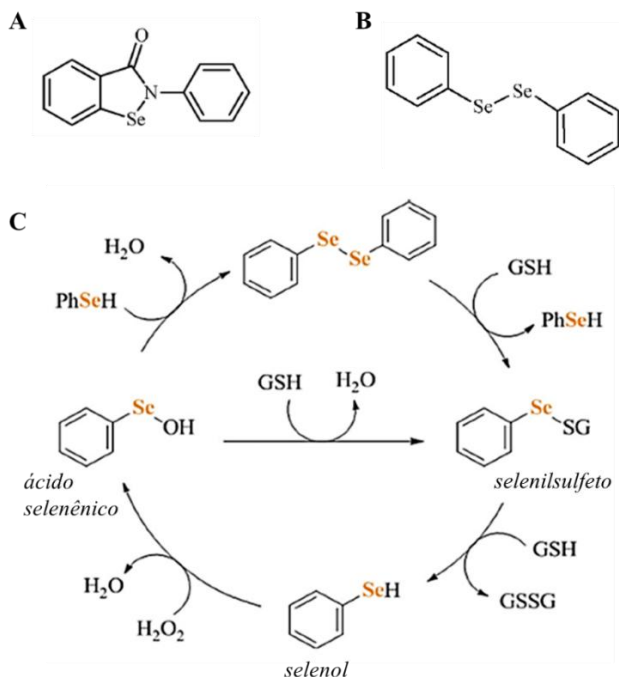


Figura 8. Compostos orgânicos de selênio e ciclo de atividade tiol-peroxidase.

A atividade mimética da GPx envolve a redução direta de pontes -Se-Se- por diferentes grupos tiol (neste caso a GSH). Inicialmente, o (PhSe)₂ reage com uma GSH originando um selenilsulfeto, o qual reage com uma segunda GSH formando selenol, este então reduz o H_2O_2 em H_2O , e gera ácido selenênico, que reage com uma molécula de PhSeH regenerando o (PhSe)₂. Figura adaptada de Nogueira e Rocha (2010) e Barbosa et al. (2017).

1.4.2. DISSELENETO DE DIFENILA (PhSe)₂

Vários estudos descreveram as propriedades farmacológicas do (PhSe)₂ em diferentes modelos experimentais de patologias associadas ao sistema nervoso central (SNC). Num modelo da doença de Parkinson (SAMPAIO et al., 2017), usando ratos tratados com 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), o (PhSe)₂ reverteu a disfunção motora e os níveis da tirosina hidroxilase (TH) diminuídos no estriado desses animais, sugerindo um potencial papel neurorestaurador para o (PhSe)₂. No modelo da doença de Alzheimer (ZAMBERLAN et al., 2014), usando *C. elegans* (CL2006/transgênico para aumentar a expressão do peptídeo A β amilóide), o (PhSe)₂ protegeu eficazmente contra a toxicidade induzida por A β . Essa proteção foi associada não apenas por atenuar a geração de oxidantes e restabelecer o estado redox, mas também por sua capacidade de atenuar a expressão do transgene A β . Esses eventos reduziram os níveis do peptídeo A β , a qual foi refletida na restauração da memória associativa avaliada por quimiotaxia. Além disso, o modelo de isquemia/reperfusão (I/R) causou aumento na geração de oxidantes e perda do potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) em mitocôndrias isoladas do hipocampo e córtex de camundongos. Esses efeitos deletérios foram significativamente reduzidos pelo tratamento com (PhSe)₂, demonstrando habilidade deste composto na manutenção do equilíbrio redox mitocondrial (DOBRACHINSKI et al., 2014). O (PhSe)₂ também foi efetivo na reversão da neurotoxicidade induzida por metilmercúrio (GLASER et al., 2014), promovendo incremento na biogênese mitocondrial e nos níveis da heme oxigenase tipo 1 (HO-1). O potencial efeito antidepressivo do (PhSe)₂ também foi recentemente relatado (DA ROCHA et al., 2012).

Com o intuito de entender os mecanismos biológicos envolvidos no efeito citoprotetor de (PhSe)₂, estudos *in vitro* foram realizados em células expostas a diferentes condições de estresse oxidativo. Em células endoteliais, o (PhSe)₂ impediu a disfunção mitocondrial induzida pela exposição ao *1,3-morpholinosydnonimine* (SIN-1), um doador de peroxinitrito, através da ativação de defesas antioxidantes celulares, como o incremento nos níveis da isoforma mitocondrial da peroxirredoxina (FIUZA et al., 2015). Além disso, este composto orgânico de selênio simples protegeu macrófagos, contra os efeitos citotóxicos da LDL oxidada, reduzindo a produção de oxidantes, o que, por sua vez, impediu a ativação do fator nuclear NF- κ B (STRALIOTTO et al., 2013). Além disso, (PhSe)₂ aumentou a atividade GPx em células endoteliais o qual foi

relacionado à ativação de Nrf2 (de BEM et al., 2013). Como foi mencionado, os compostos orgânicos de selênio e entre eles o $(\text{PhSe})_2$, foram sintetizados com a finalidade de imitar a atividade peroxidase da GPx (atividade GPx-like ou tiol peroxidase) e, portanto, proteger contra condições relacionadas ao estresse oxidativo (BARBOSA et al., 2017). No entanto, somente a atividade de tiol-peroxidase destes compostos parece não ser suficiente para justificar as suas propriedades antioxidantes observadas em sistemas biológicos (BARTOLINI et al., 2015; BARBOSA et al., 2017) (Fig. 9).

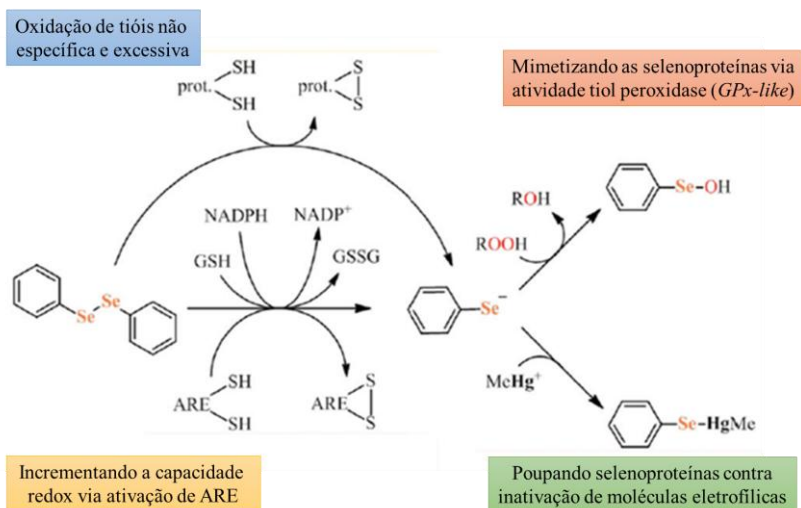


Figura 9. Mecanismo bioquímico envolvido no efeito protetor do $(\text{PhSe})_2$. A redução dos compostos orgânicos de selênio por moléculas que contêm grupos sulfidril geram o intermediário selenolato (R-Se^-) que reage com moléculas eletrofílicas (por exemplo, MeHg) ou descompõe peróxidos tóxicos (atividade tiol-peroxidase). Além disso, a oxidação de proteínas contendo grupos sulfidril pode ativar vias de transcrição relacionadas à modulação da resposta antioxidante (por exemplo, Keap1/Nrf2). No entanto, os conhecimentos em relação à contribuição de cada via para as propriedades farmacológicas dos compostos orgânicos de selênio não estão completamente elucidadas. Figura adaptada de Barbosa et al. (2017).

1.4.3. COMPOSTOS DERIVADOS DO PROBUCOL

O probucol (PB) é um agente fenólico hipolipemiante com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, utilizado inicialmente no

tratamento clínico e prevenção de doenças cardiovasculares (YAMASHITA et al., 2008). Por outro lado, alguns trabalhos vêm mostrando efeitos neuroprotetores deste composto ou de seus derivados (SANTOS et al., 2012; RIBEIRO et al., 2013; COLLE et al., 2013b; COLLE et al., 2016). Dentre os efeitos neuroprotetores descritos para este composto, destaca-se, por exemplo, os resultados obtidos de experimentos *in vivo* os quais mostraram que PB impediu deficiências sinápticas hipocámpais e cognitivas induzidas pela injeção intracerebroventricular de agregados do peptídeo β 1-40 amilóide em camundongos, um modelo da doença de Alzheimer (SANTOS et al., 2012). Além disso, o PB protegeu contra o dano pró-oxidativo induzido por ácido 3-Nitropropiónico (3-NP) em ratos, um modelo da doença de Huntington (COLLE et al., 2013b) e contra a neurotoxicidade induzida por 6-hidroxidopamina em ratos, um modelo da doença de Parkinson (RIBEIRO et al., 2013). Estudos recentes mostraram que o PB inibiu a inflamação e apoptose neuronal, em camundongos um modelo de dano no cordão espinal, através da ativação da via Nrf2/ARE induzindo a modulação do sistema antioxidante (ZHOU et al., 2017), o qual é o mecanismo de proteção mais conhecido para este composto (STOCKER, 2009). Os efeitos protetores do PB também foram observados em condições *in vitro* em culturas primárias de neurônios cerebelares expostos a MeHg (FARINA et al., 2009) e em sinaptosomas enriquecidos de mitocôndrias derivados do cérebro de ratos expostos a 3-NP (COLLE et al., 2013a).

Apesar dos efeitos benéficos do PB, o uso clínico do mesmo em humanos foi associado a efeitos adversos e foi então retirado do mercado em alguns países por diminuir os níveis plasmáticos da lipoproteína de alta densidade (HDL) (TARDIF; GREGOIRE; L'ALLIER, 2002) e por induzir arritmias ventriculares (MCDOWELL et al., 1994; TARDIF et al., 2003). Com o intuito de diminuir os efeitos colaterais do PB e aumentar sua eficiência, principalmente em ensaios pré-clínicos, novos derivados deste composto foram sintetizados. Entre estes compostos, destaca-se o succinobucol, que parece não causar efeitos colaterais cardíacos (TARDIF, 2003), além disso, protegeu células neuronais do tipo SH-SY5Y contra o estresse oxidativo induzido por 3-NP por aumentar os níveis de GSH através da regulação positiva da atividade e expressão gênica da GCL (COLLE et al., 2016). Recentemente um novo derivado do probucol foi sintetizado, o RC513 que é um composto orgânico contendo selênio (Fig. 10), desenvolvido no Departamento de Química da UFSC (Laboratório LabSelen, coordenado pelo Prof. Antônio

Luiz Braga). Estudos experimentais em relação a seus efeitos citoprotetores estão sendo realizados pelo nosso grupo de pesquisa.

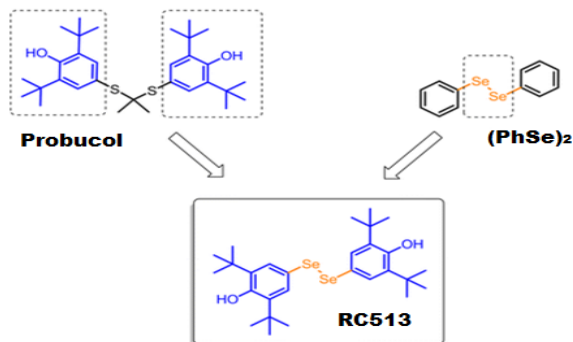


Figura 10. Composto inédito RC513. A molécula RC513 foi desenvolvida para ter características do probuocol (diterbutil-fenol) e do (PhSe)₂ com aferenças de Se-Se. Figura adaptada de Quispe et al. (2018). Patente de Invenção BR 10 2018 008167 5.

1.5. MODELO DE ESTRESE OXIDATIVO *IN VITRO* INDUZIDO POR tBuOOH

Diferentes modelos celulares são utilizados para estudar os efeitos tóxicos do estresse oxidativo, bem como as ações citoprotetoras de compostos com potenciais propriedades antioxidantes/terapêuticas (GILLE; JOENJE, 1992). As células HT22, uma linhagem de células imortalizadas de hipocampo murino (DAVIS; MAHER, 1994), possuem propriedades colinérgicas funcionais (LIU; LI; SUO, 2009) e são amplamente utilizado como modelo *in vitro* para identificar possíveis compostos neuroprotetores (POTEET et al., 2012; JIRÁSEK; AMSLINGER; HEILMANN, 2014; LEE et al., 2015). Como já foi mencionado anteriormente, neurônios são sensíveis às ações citotóxicas promovidas por agentes oxidantes, relacionando ao estresse oxidativo como potencial evento primário das doenças neurodegenerativas. Assim a utilização de modelos de estresse oxidativo *in vitro* podem contribuir para a pesquisa e entendimento dos mecanismos biológicos responsáveis pelos efeitos neuroprotetores. Por exemplo, a exposição de células HT22 ao glutamato e/ou compostos pró-oxidantes permite estudar a cascata de eventos oxidativos indutores de morte celular neuronal a qual está contextualizada em diversas condições neurodegenerativas (TOBABEN et al., 2011; KUMARI; MEHTA; LI, 2012; SALVI et al., 2016). De

particular relevância nesta tese, destaca-se a ativação citotóxica promovida pelo hidróperóxido de terc-butila (tBuOOH), um oxidante orgânico permeável à membrana celular, usada em diversos modelos biológicos *in vitro* (Tabela 2).

Tabela 2. Efeitos citotóxicos do tBuOOH em diferentes células e tecidos.

Tipo de célula/tecido	Espécie	Concentração/Tempo	Efeitos do tBuOOH	Referência
Mitocôndrias isoladas de fígado	Rato/Wistar	250 – 500 μ M/ 60 h	-diminuição de GSH -aumento de GSSG -inibição da atividade da piruvato desidrogenase	Crane et al., 1983
Hepatócitos isolados de fígado	Rato/Sprague-Dawley	100 μ M/ 1-60 min	-oxidação de NADH/ NADPH -formação de espécies oxidantes -abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial -despolarização do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) -perda da viabilidade	Niemine et al., 1997
SH-SY5Y (Neuroblastoma)	Humano	300, 500, 1000 μ M/ 5 h	-incremento na geração de espécies oxidantes, sem participação de Ca^{+2} no dano celular	Amoroso et al., 1999
Hepatócitos	Rato/Sprague-Dawley	500 μ M/ 40 min	-diminuição de GSH -lipoperoxidação -radical peróxil envolvido na ativação de PLA2	Martin et al., 2001
Células HT22 (Hipocampo)	<i>Mus musculus</i>	30 μ M/ 16 h	-diminuição da viabilidade celular (MTT)	Moosmann et al., 2001
Hepatócitos	Rato/Sprague-Dawley	400 - 500 μ M/ 1-8 h	-produção de espécies oxidantes -lipoperoxidação -liberação de citocromo c/Bcl2 -fragmentação de DNA -apoptose	Haidara et al., 2002
Células HepG2 (hepatoma)	Humano	5 $\times 10^{-4}$ M/ 1-6 h	-hiperpolarização da membrana mitocondrial/perda do $\Delta\Psi_m$ -ativação de caspase 3-9 -liberação de citocromo c -fragmentação de DNA -apoptose	Piret et al., 2004
Hepatócitos/mitocôndrias isoladas do fígado	Rato/Wistar	500 a 3000 μ M/ 5 min	-inibição da NADH desidrogenase mitocondrial- CI	Drahota et al., 2005
Células HT22 (Hipocampo)	<i>Mus musculus</i>	60 μ M/ 24 h	-diminuição da viabilidade celular (MTT)	Kang et al., 2005
SH-SY5Y/N2A (Neuroblastoma)	Humano/ <i>Mus musculus</i>	25, 50, 100 e 1000 μ M/ 3, 12, 24 h	-aumento de espécies oxidantes -lipoperoxidação -despolarização mitocondrial -translocação de fosfatidil colina -condensação nuclear -aumento da atividade caspase -apoptose	Zhao et al., 2005
U-937 macrófagos	Humano	400 μ M/ 1-4 h	-incremento de espécies oxidantes, Ca^{2+} , decrescimento do $\Delta\Psi_m$ -depleção de GSH -ativação de caspase 3 -aumento de Bax/Bad -liberação de citocromo c -fragmentação de DNA -apoptose	Kanupriya et al., 2007

Fibroblasto	Humano	20 μ M/ 24 h	-aumento espécies oxidantes -ativação de iNOS -lipoperoxidação -depleção de GSH -incremento de Bax -dano ao DNA (DAPI) -ativação da via pró-inflamatória (p38MAPK/ NF- κ B)	Bae et al., 2010
Hepatócitos L02	Humanos	150 μ M/ 3 h	-aumento de espécies oxidantes -lipoperoxidação -abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial -liberação de LDH	Chen et al., 2010
Neurônios de gânglio dorsal	<i>Mus musculus</i>	1000 μ M / 5 min	-lipoperoxidação em organelas -inibição do transporte axonal de mitocôndrias e lisossomos	Isonaka et al., 2011
HT22 (Hipocampo)	<i>Mus musculus</i>	10 μ M/ 16-20 h	-desregulação da concentração de Ca^{2+}	Kaja et al., 2011
Células 661W (fotorreceptores-retina)	<i>Mus musculus</i>	50 μ M/ 30 min	-perda da capacidade de reserva mitocondrial	Perron et al., 2013
HT22 (hipocampo)	<i>Mus musculus</i>	50 μ M/3h-logo foi lavado	-diminuição da viabilidade celular (MTT)	Josey et al., 2013
HT22 (hipocampo)	<i>Mus musculus</i>	300 μ M/ 20 h	-diminuição da viabilidade celular (MTT)	Jirásek et al., 2014
HepG2	Humano	50 μ M/ 12 h	-formação de espécies oxidantes -diminuição da viabilidade celular (MTT)	Lee et al., 2014
Hepatócitos	Rato/Wistar	250 μ M / 5 min	-formação de espécies oxidantes -lipoperoxidação -diminuição de GSH -decréscimo do $\Delta\Psi_m$ -redução da taxa do RCR do CI	Kucera et al., 2014
HepG2 (hepatoma)	Humano	100 μ M/ 12 h	-formação de espécies oxidantes -diminuição de GSH -apoptose	Kim et al., 2014
Hepatócitos L02	Humano	25-400 μ M/ 6 h	-formação de espécies oxidantes -apoptoses	Hu et al., 2015
RAW 264.7 macrófagos	<i>Mus musculus</i>	5 000 μ M/ 5 min-1 h	-formação de espécies oxidantes -diminuição de GSH -diminuição do $\Delta\Psi_m$ -disfunção mitocondrial -apoptose	Lv et al., 2017
Hep G2/FL83B Fígado	Humano/ <i>Mus musculus</i>	1500 μ M/24 h	-formação de espécies oxidantes -decréscimo de GSH -ativação de caspase 3 -indução do complexo Bax/Bad -liberação de citocromo <i>c</i> -superexpressão de PDIA6 -apoptose	Shen et al., 2018
PC12 (Neuroblastoma de origem embrionário)	Rato	100 μ M/ 1 h	-formação de espécies oxidantes -disfunção mitocondrial -diminuição do $\Delta\Psi_m$ e da produção de ATP -ferroptose	Wu et al., 2018

RCR: *respiratory control ratio*; CI: Complexo I; PDIA6: *disulphide-isomerase A6* (chaperona redox no retículo endoplasmático); PLA2: Fosfolipase A2; $\Delta\Psi_m$: Potencial de membrana mitocondrial; ATP: Adenosina trifosfato.

Em relação ao mecanismo pelo qual o tBuOOH induz estresse oxidativo e toxicidade nas células, na literatura é descrito que *i*) ao entrar na célula, o tBuOOH pode ser reduzido a ter-butanol (tBOH) pela GPx depletando a GSH, e/ou *ii*) o tBuOOH pode reagir com ions Fe^{2+} e ser convertido a radical peroxil (tBO \cdot), o qual induz lipoperoxidação de membranas celulares e de organelas como a mitocôndria (MARTÍN et al., 2001; HAIDARA et al., 2002; PIRET et al., 2004; KANUPRIYA et al., 2007) (Fig. 11). Segundo (DRAHOTA et al., 2005), os aglomerados ferro-enxofre ou grupos SH nas enzimas do complexo I (NADH desidrogenase) mitocondrial são seletivamente suscetíveis aos efeitos do tBuOOH, resultando na geração aumentada de $O_2^{\cdot-}$ (MURPHY, 2009).

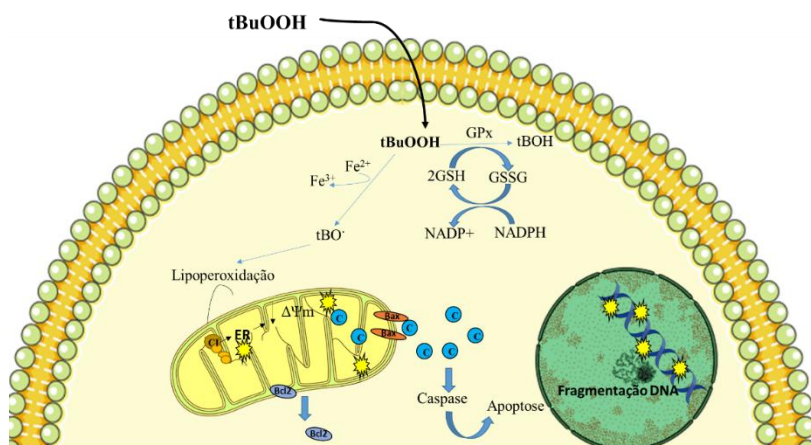


Figura 11. Mecanismo pelo qual o tBuOOH induz estresse oxidativo e toxicidade nas células. Adaptado de Martin et al., (2001), Haidara et al. (2002) e Kanupriya et al., (2007). *Templates* obtidos de “*Servier Medical Art*”.

O tBuOOH também induz a rápida oxidação do NADPH mitocondrial e diminuição do $\Delta\Psi_m$, fato que promove a abertura do poro de transição mitocondrial (mPTP) (NIEMINEN et al., 1997) e ativação de apoptose celular evidenciada pelo aumento da relação Bax/Bad e pela liberação de citocromo *c* (Prasad, et al., 2007), aumento da atividade da caspase que classicamente levam à morte celular por apoptose (ZHAO et al., 2005). Embora os eventos relacionados ao estresse oxidativo induzido por tBuOOH sejam bem descritos em hepatócitos (CHEN et al., 2010;

KIM; LEE; PARK, 2014; KUČERA et al., 2014), em células neuronais, o tBuOOH inibe funções essenciais ao funcionamento das sinapses, o transporte axonal de organelas, afetando o movimento anterógrado e retrógrado de mitocôndrias e lisossomos. Essa inibição foi associada à peroxidação lipídica na membrana plasmática e em maior quantidade na membrana mitocondrial e lisossomos, que foi revertida pelo clássico antioxidante α -tocoferol. Esses resultados sugerem que a inibição do transporte axonal promovida pelo tBuOOH ocorreu via peroxidação lipídica (ISONAKA; HIRUMA; KAWAKAMI, 2011). Estudos mais recentes demonstram que tBuOOH induziu apoptose e estresse de retículo endoplasmático em hepatócitos pela superexpressão de PDI A6, proteína que inibe a agregação de proteínas mal dobradas e exibe tanto atividade isomerase como chaperona no retículo endoplasmático (SHEN et al., 2018). Por outro lado, estudos realizados na linhagem, PC12, originária de glândula adrenal de rato, sugerem que a ferroptose associada à disfunção mitocondrial está envolvida na morte de PC12 induzida por tBuOOH tendo em vista que a adição de um quelante de ferro (*deferoxamina*) e inibidor de ferroptose (*ferrostatina-1*) revertem a toxicidade (WU et al., 2018).

Em resumo devido ao aumento da prevalência de doenças neurodegenerativas nos últimos anos e à ausência de tratamentos efetivos para muitas destas doenças, esforços são direcionados a encontrar novos compostos ou fármacos que possam proteger contra o dano oxidativo e disfunção mitocondrial, eventos associados às doenças neurodegenerativas. Neste sentido, os compostos orgânicos de selênio têm recebido grande destaque em nossas pesquisas devido as suas diversas propriedades farmacológicas, principalmente atividade antioxidante, antiinflamatória e antiaterogênica. Inicialmente, as propriedades antioxidantes destes compostos foram atribuídas a sua capacidade de mimetizar a atividade da GPx, todavia, os estudos mais recentes sugerem que estes compostos são capazes de ativar fatores de transcrição responsáveis por modular os sistemas antioxidantes.

Contextualizando, muitos estudos mostraram o comprometimento do sistema antioxidante nas doenças neurodegenerativas, como por exemplo, a diminuição da atividade da GPx em cérebros pós-morte de pacientes com doenças de Parkinson (KISH; MORITO; HORNYKIEWICZ, 1985) e no soro de pacientes com doença de Alzheimer (MANOLOV, 2017). Assim como, diversas evidências indicam que a GPx também pode estar envolvida em processos celulares relacionados à degradação dos corpos de Lewy, característico da doença de Parkinson (POWER; BLUMBERGS, 2009) e que o

incremento da atividade desta enzima apresenta efeitos neuroprotetores em modelos da doença de Huntington (MASON et al., 2013). Podemos dizer que a enzima GPx tem uma função chave na detoxificação de peróxidos, e qualquer alteração funcional desta enzima pode potencialmente comprometer o estado redox celular e incrementar ou acelerar uma condição neurodegenerativa.

No presente estudo abordou-se o estresse oxidativo como um fator relevante na neurodegeneração, e buscou-se avaliar o efeito de compostos orgânicos de selênio na modulação das respostas antioxidantes, bem como esclarecer seus possíveis mecanismos de proteção em células HT22. Baseado nos resultados da presente tese, acreditamos na possibilidade do emprego futuro destes compostos orgânicos de selênio, como eficientes agentes preventivos e/ou terapêuticos em doenças neurodegenerativas relacionadas ao estresse oxidativo.

2. HIPÓTESE

- Ambos os compostos, (PhSe)₂ e RC513, protegem as células neuronais HT22 frente ao estresse oxidativo modulando positivamente o sistema antioxidante dependente de glutatona.
- Ambos os compostos, (PhSe)₂ e RC513, apresentam diferenças no mecanismo de proteção relacionada a expressão gênica de enzimas antioxidantes.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Estudar os mecanismos moleculares envolvidos no possível efeito protetor de compostos orgânicos de selênio contra a toxicidade induzida por hidroperóxido de terc-butila (tBuOOH) em células imortalizadas de neurônios hipocâmpais murinos (HT22).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Investigar o mecanismo de proteção do (PhSe)₂ contra o estresse oxidativo em células HT22 (Desenvolvido no capítulo I).
- Investigar o mecanismos de proteção de um novo derivado do probucol, RC513, contra o estresse oxidativo em células HT22 (Desenvolvido no capítulo II).
- Avaliar e comparar a eficácia de proteção entre os compostos (PhSe)₂ e RC513, e seus respectivos mecanismos de proteção frente a diferentes estressores em células HT22 (Desenvolvido no capítulo III).

4. ORGANIZAÇÃO DA TESE

A metodologia geral utilizada para o desenvolvimento de todas as diferentes etapas desta tese está apresentada em conjunto. A Figura 12 apresenta de forma resumida os procedimentos experimentais executados nesta tese. No capítulo I e II, foi avaliado o efeito protetor de $(\text{PhSe})_2$ e RC513 sobre a viabilidade celular, níveis de GSH e NPSH, atividade GPx e transcritos de *Gpx1* e *Gclc*, mostrando o envolvimento do sistema dependente de glutathiona na proteção de ambos compostos. No Capítulo III, foi realizado um estudo comparativo dos efeitos de RC513 e $(\text{PhSe})_2$ para conhecer melhor o mecanismo de proteção e para determinar possíveis diferenças entre a proteção de ambos os compostos. Neste terceiro capítulo, mostrou-se também a proteção oferecida pelos compostos frente a outros estressores (SIN-1, Glutamato e MeHg) através de medidas da atividade GPx e viabilidade celular. Ao final, é apresentada uma discussão geral, bem como considerações finais - conclusões e perspectivas do trabalho.

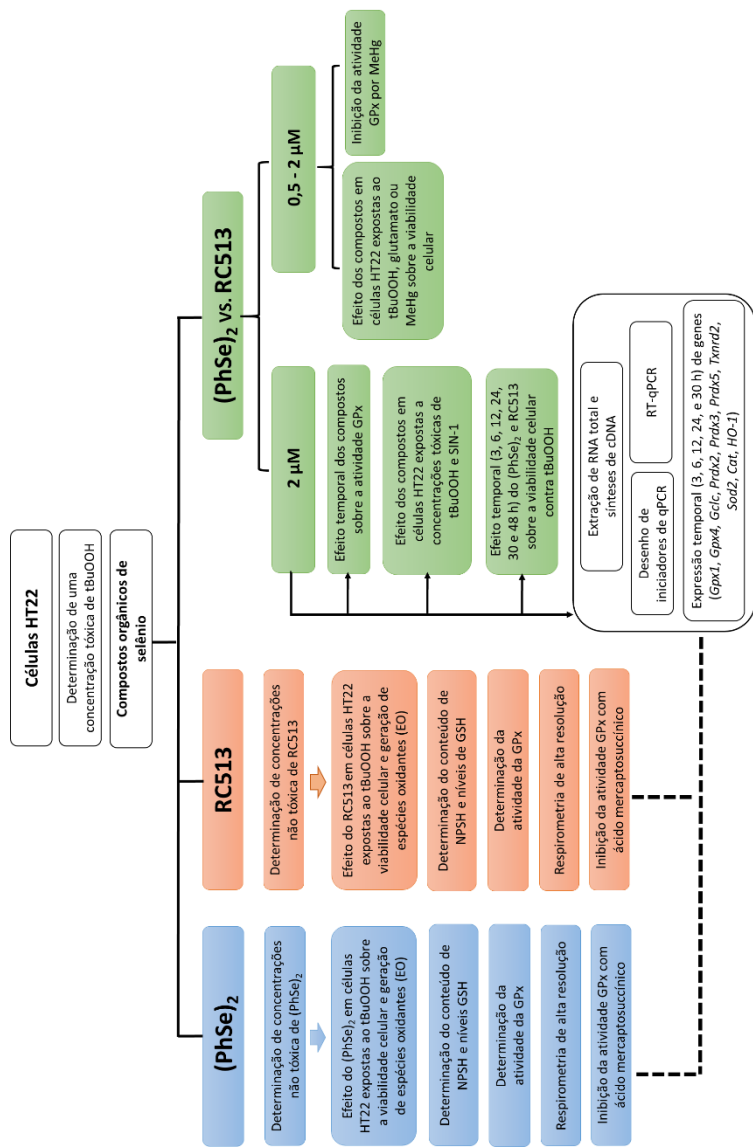


Figura 12. Resumo dos protocolos experimentais utilizados no presente estudo. As cores azul, laranja e verde correspondem aos métodos utilizados no Capítulo I, Capítulo II e Capítulo III, respectivamente

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. COMPOSTO DISSELENETO DE DIFENILA (PhSe)₂

O disseleneto de difenila (PhSe)₂ com uma pureza química (99,9 %) foi sintetizado no departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria em colaboração com o Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha. Para a realização dos experimentos, o composto (PhSe)₂ foi solubilizado em DMSO e, posteriormente, diluído em meio de cultura contendo uma concentração máxima de DMSO de 0,05%.

5.2. COMPOSTO RC513

O composto RC513, um derivado do probucol, com uma pureza química (>95%), foi sintetizado no departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina sob a supervisão do Prof. Dr. Antonio Luiz Braga. Para realização dos experimentos, o composto RC513 foi solubilizado em DMSO e, posteriormente, diluído em meio de cultura, contendo uma concentração máxima de DMSO de 0,05%.

5.3. CULTURA CELULAR DE NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS HT22

As células HT22, uma linhagem de células imortalizadas a partir de cultura primária do hipocampo murino, foram gentilmente doadas pelo Dr. David Schubert (Salk Institute, La Jolla, CA, USA) e cultivadas com *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 2 mM de glutamina, 10 mM de HEPES, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e 5% de soro fetal bovino (SFB, Gibco/Invitrogen), 24 mM de glicose e 44 mM NaHCO₃. As células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. As células foram subcultivadas em confluência de 80-90% e usadas entre as passagens 3^a e 12^a. As suspensões de células foram semeadas em placas de Petri (100 x 20 mm), placas de 96 ou placas de 6 poços em diferentes densidades celulares, dependendo do procedimento experimental, conforme descrito abaixo.

5.4. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

Para os ensaios de viabilidade celular, as células foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade celular de 1×10^3 células/poço e cultivadas durante 24 h. Para determinar a toxicidade de tBuOOH, as células HT22 foram pré-tratadas com 0,05% de DMSO (usado como veículo dos compostos orgânicos de selênio nos experimentos seguintes)

e mantidas em cultura por mais 48 h. Em seguida, (i) para determinar uma concentração tóxica de tBuOOH, as células foram expostas a concentrações crescentes de tBuOOH (10, 20, 40, 70 e 100 μM) durante 12 h; (ii) para determinar o efeito temporal do tBuOOH, as células foram incubadas com tBuOOH (40 μM) durante 2, 4, 5, 6, 7, 9 e 12 h. Em experimentos paralelos, (iii) para avaliar o efeito concentração-resposta *per se* dos compostos orgânicos de selênio, as células foram pré-tratadas com $(\text{PhSe})_2$ ou RC513 (1, 3, 6 e 10 μM) ou veículo (DMSO 0,05%) durante 48 h; (iv) para avaliar o efeito protetor de $(\text{PhSe})_2$ ou RC513, as células foram pré-tratadas com concentrações não tóxicas (0,5, 1, 2 e 5 μM) ou veículo (DMSO, 0,05%) durante 48 h, em seguida, o meio de cultura foi substituído por um meio novo sem compostos e as células foram expostas a tBuOOH (40 μM) durante 12 h; (v) por fim, para estabelecer o potencial mecanismo envolvido no efeito protetor dos compostos orgânicos de selênio, as células foram pré-tratadas com $(\text{PhSe})_2$ ou RC513 (2 μM) ou veículo (DMSO, 0,05%) durante 48 h e depois o ácido mercaptosuccínico (MS - inibidor de GPx - 5 mM) foi adicionado 30 min antes da exposição ao tBuOOH (40, 70 e 100 μM) por 12 h adicionais. O tBuOOH foi diluído em água ultrapura e sempre preparado no momento do uso.

Para comparar os efeitos dos compostos RC513 e $(\text{PhSe})_2$ sobre a viabilidade celular, células HT22 foram cultivadas com densidade inicial de 1×10^3 células/poço em placa de 96 poços durante 24 h. Em seguida, para determinar o efeito protetor dos compostos frente a altas concentrações de tBuOOH, as células foram pré-tratadas com 2 μM de cada composto por 48 h e seguidamente expostas a diferentes concentrações de tBuOOH (20 - 600 μM) ou SIN-1 (0,5 - 2 mM) ou veículo (DMSO 0,05%) por 12 h.

Para comparar os efeitos do pré-tratamento por 24 h com os compostos RC513 e $(\text{PhSe})_2$ sobre a viabilidade celular, frente à co-exposição com glutamato ou MeHg por 24 h adicionais, células HT22 com densidade de 2×10^3 células/poço foram cultivadas em placa de 96 poços durante 24 h. Em seguida, (i) para determinar o efeito protetor dos compostos frente a glutamato, as células HT22 foram pré-tratadas com os compostos nas concentrações de 0,5 e 2 μM por 24 h, seguidamente expostas a diferentes concentrações de glutamato (1-10 mM) por 24 h adicionais; (ii) para determinar uma concentração tóxica de MeHg, as células foram pré-tratadas com o veículo (DMSO 0,05%) por 24 h, seguidamente foram expostas a MeHg (10 nM - 1000 nM) por 24 h adicionais; (iii) para realizar um estudo tempo-resposta (3 a 24 h) do efeito do MeHg, as células HT22 foram pré-tratadas com o veículo os

compostos por 24 h e expostas a 300 nM, 600 nM e 1000 nM de MeHg por 24 h adicionais; (iv) para determinar diferenças dos efeitos de RC513 e (PhSe)₂, as células foram pré-tratadas com os compostos a uma concentração de 0,5 e 2 µM por 24 h e seguidamente expostas a 10 – 1000 nM de MeHg.

A viabilidade celular foi medida por dois ensaios, que avaliam diferentes eventos da homeostase celular. (1) A redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (ensaio MTT), que avalia a atividade da desidrogenases mitocondriais funcionais, foi conduzida conforme descrito anteriormente por Mosmann (MOSMANN, 1983). Neste ensaio, o meio foi retirado e adicionado 100 µL/poço de uma solução de MTT (0,5 mg/mL) e incubado por 1 hora a 37 °C. Em seguida, a solução de MTT foi removida e 100 µL/poço de DMSO foi adicionado para dissolver os cristais de formazan formados intracelularmente. A absorbância foi determinada a 540 nm e os resultados foram expressos como porcentagem em relação às células controle (tratadas com o veículo, DMSO 0,05%). (2) O ensaio da incorporação do Iodeto de propídeo (IP), que é excluído pelas células vivas, mas que entra rapidamente nas células com membranas danificadas ligando-se ao DNA, tornando-as fluorescentes, foi avaliado conforme descrito anteriormente por Riccardi e Nicoletti (RICCARDI; NICOLETTI, 2006). Neste ensaio, 5 µL de uma solução de IP (0,149 mg/mL) foi adicionado ao meio de cultura e, após incubação por 20 min a 37°C. Os resultados dos ensaios de IP foram expressos como porcentagem de incorporação de IP (porcentagem de morte, onde o valor de 100% representa células controle tratadas com 2% de Triton X-100 durante 15 min). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

5.5. DETERMINAÇÃO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES OXIDANTES (EO)

A geração intracelular de EO foi medida usando a sonda fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) segundo protocolo cinético de Amoroso et al. (1999) e a geração de ânions superóxido mitocondriais foi medida usando a sonda fluorescente MitoSOX. Resumidamente, as células HT22 foram cultivadas a uma densidade inicial de 1 x 10³ células/poço em placas de 96 poços durante 24 h, seguida pelo tratamento com os compostos (PhSe)₂ ou RC513 (2 µM) ou veículo (DMSO, 0,05%) por 48 h.

i) Para determinação da geração de EO, foi adicionado 1 µM de H₂DCFDA ao meio de cultura e, após 30 min de incubação a 37°C, o

meio foi removido e substituído por uma solução tamponada de sal de Hank (HBSS). As células foram expostas a tBuOOH (40, 70 ou 100 μ M). A intensidade de fluorescência, que representa a oxidação de DCFH₂ por EO, foi monitorada e registrada cineticamente durante 2 h a 37°C em um leitor de microplacas fluorimétricas (Spectramax Paradigm) com uma excitação a 490 nm e emissão a 520 nm. Os resultados foram expressos como a área sob a curva (A.U.C).

ii) Para ânions superóxido mitocondriais, 5 μ M de MitoSOX foram dissolvidos em tampão HBSS, adicionado às células e incubado por 15 min a 37°C. Posteriormente, o meio foi removido e trocado por tampão HBSS fresco. As células foram expostas a tBuOOH (40, 70 ou 100 μ M) durante 4 h e a intensidade de fluorescência foi registrada em um leitor de microplacas fluorimétricas (Spectramax Paradigm) com excitação a 510 nm e emissão a 580 nm. Os resultados de MitoSOX foram expressos como porcentagem de células controle e não expostas ao tBuOOH.

5.6. DETERMINAÇÃO DE TIÓIS NÃO PROTEICOS (NPSH) E DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

Para determinar o efeito dos compostos sobre a quantidade de NPSH e os níveis de GSH, as células HT22 (1 x 10⁵ células/poço) foram semeadas em placas de 6 poços e após 24 h foram pré-tratadas com (PhSe)₂ ou RC513 (2 μ M) ou veículo (DMSO, 0,05%) durante 48 h. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS (100 Mm) a 37°C e, em seguida, coletadas em 150 μ L de tampão PBS (pH 7,4) com 0,05% Triton X-100, e misturadas numa solução de 10% de ácido tricloroacético. Após centrifugação (5000 x g a 4°C durante 10 min), o sobrenadante foi utilizado para determinar o conteúdo de NPSH segundo o método espectrofotométrico descrito por Ellman (1959) e para o conteúdo de GSH foi utilizado o método fluorimétrico descrito por Hissin e Hilf (1976).

Para determinar o conteúdo de NPSH, um volume de 50 μ L de sobrenadante foi incubado com 25 μ L de DTNB (10 mM) e 125 μ L de tampão fosfato de potássio (1 M) durante 15 min à temperatura ambiente. Para determinar o conteúdo de GSH, um volume de 30 μ L de sobrenadante foi incubado com 10 μ L de ortoftaldeído (0,1% p/v em metanol) e 160 μ L de Na₂HPO₄ (100 mM) durante 15 min à temperatura ambiente. O ensaio NPSH foi lido a 412 nm e o de GSH a 350 nm de excitação e 420 nm de emissão, os quais foram lidos em um espectrofluorômetro SpecaxMax Paradigm Multi-Mode Microplate

Reader (Molecular Devices). Os níveis de GSH e NPSH foram calculados usando uma curva padrão de GSH. Os resultados foram expressos como nmol GSH por miligrama de proteína ou percentagem do grupo controle (veículo).

5.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE

Para determinar se o efeito protetor dos compostos estava relacionado à atividade Glutationa peroxidase, as células HT22 foram semeadas a uma densidade inicial de 1×10^5 células/poço em placa de 6 poços durante 24 h a 37°C, seguido de um pré-tratamento com (PhSe)₂ ou RC513 (2 µM) ou veículo (DMSO, 0,05%) por 48 h. Em seguida, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas uma vez com tampão fosfato-salino (PBS). As células foram dissociadas com 0,05% de tripsina/1 mM EDTA durante 2 min; posteriormente, foi adicionado meio de cultura (DMEM com FBS a 5%) (razão 1: 1) para inativar a tripsina. As células foram centrifugadas a 500 x g durante 3 min à temperatura ambiente e o precipitado (sedimento celular) foi armazenado a -80 °C até o ensaio. Para o ensaio, o sedimento celular foi suspenso em 50 µL de tampão gelado a pH 7,4 (Tris-HCl 20 mM, sacarose 0,25 M), contendo β-mercaptoetanol (0,4 mM). O material foi sonicado três vezes por 10 min em gelo (vortex de 20 seg em cada intervalo de tempo), seguido de centrifugação a 10 000 x g durante 15 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado após centrifugação e a atividade da GPx foi avaliada segundo Wendel (1981) e com otimização para lisados em células HT22 (PANEE et al., 2007). As concentrações no meio de ensaio enzimático foram: hidroperóxido de terc-butila (0,32 mM), GSH (1,88 mM), GR (84 mU), EDTA (1 mM), NaN₃ (1 mM), NADPH (0,2 mM) e Tris-HCl pH 7,6 (0,1 M). A atividade enzimática foi expressa como nmol de NADPH consumido por min por mg de proteína. Em outro conjunto de experimentos, as células (na mesma densidade) foram semeadas durante 24 h a 37°C, seguido de tratamento com (PhSe)₂ ou RC513 (2 µM) ou veículo (DMSO, 0,05%) durante 43 h, depois o meio foi removido e trocado por meio fresco. Posteriormente, foi adicionado ácido mercaptosuccinico (MS) (5 mM) ao meio de cultura e incubou-se durante 12 h, seguido pela determinação da atividade GPx, como mencionado anteriormente.

Para comparar os efeitos dos compostos RC513 e (PhSe)₂ sobre a atividade GPx, as células HT22 foram semeadas a uma densidade inicial de 1×10^5 células/poço em placa de 6 poços durante 24 h a 37°C. (i) Para

determinar o efeito temporal do $(\text{PhSe})_2$ e RC513, sobre a atividade, as células foram pré-tratadas com 2 μM de cada composto ou veículo (DMSO, 0,05%) durante 3, 6, 12, 24, 30 e 48 h; (ii) para determinar o efeito das concentrações (0,5 e 2 μM) de $(\text{PhSe})_2$ e RC513 sobre a atividade GPx, as células HT22 foram pré-tratadas com cada composto ou veículo por 48 h; (iii) para avaliar o efeito do MeHg sobre a atividade GPx nas células HT22 pré-tratadas com os compostos (0,5 ou 2 μM) ou veículo por 48 h, as células foram expostas a 600 nM de MeHg por 12 h.

5.8. OXIMETRIA DE ALTA RESOLUÇÃO

Para avaliar a função mitocondrial das células HT22 expostas a tBuOOH, as células (3×10^5 células/placa Petri) foram semeadas e tratadas com 2 μM dos compostos $(\text{PhSe})_2$ ou RC513 ou veículo por 48 horas seguidas de 2 h ou 4 h de exposição a 40 μM de tBuOOH. Após o período de exposição, as células foram coletadas usando uma solução de tripsina a 0,05%/ EDTA 1 mM. A tripsina foi inativada com DMEM 5% de soro bovino fetal e as células foram coletadas e centrifugadas a $1200 \times g$ por 3 min e ressuspendidas em DMEM 5% de soro para medições do consumo de O_2 em células intactas em câmara fechada do respirômetro de alta resolução, com um volume final de 2 mL. Em seguida, 1×10^6 células (por cada câmara) foram utilizadas no ensaio. O processo iniciou com a determinação da taxa de consumo de oxigênio (OCR) basal, a qual é definida como a respiração sem substrato ou efetores adicionais. Após a estabilização do fluxo respiratório, a ATP sintase foi inibida com oligomicina (1,25 μM), a fim de estimar a OCR ligado à síntese de ATP. Para determinar capacidade respiratória máxima que as células podem sustentar, o ionóforo Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP), desacoplador da fosforilação oxidativa, foi titulado em injeções subsequentes de 0,5 μM por injeção. Após a titulação com FCCP, a CTE de elétrons foi inibida com antimicina A (2,5 μM) e a taxa do fluxo de oxigênio detectada nestas condições foi definida como o consumo de oxigênio extra-mitocondrial. A aquisição e as análises de dados foram realizadas usando o programa DatLab software (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Os parâmetros calculados foram: 1) OCR basal; 2) OCR ligado à síntese de ATP; 3) Capacidade respiratória máxima e 4) Capacidade de reserva mitocondrial= (Capacidade respiratória máxima - respiração basal).

5.9. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRITOS DE GENES ENVOLVIDOS COM O SISTEMA ANTIOXIDANTE

5.9.1. Extração de RNA total e sínteses de cDNA

Para determinar o efeito dos compostos sobre a expressão de genes envolvidos no sistema antioxidante, as células HT22 ($3,5 \times 10^4$ células/poço) foram semeadas em placas de 6 poços e tratadas com $2 \mu\text{M}$ dos compostos $(\text{PhSe})_2$ e RC513 ou veículo. O RNA total foi extraído em diferentes tempos (3 h, 6 h, 12 h, 24 h e 30 h) de tratamento ou veículo usando Tri-reagent (Sigma-Aldrich). Em resumo, as amostras foram homogeneizadas em 1 mL de Tri-reagent e a extração de RNA foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram centrifugadas ($12\ 000 \times g$ por 10 min a 4°C) e o sobrenadante foi recuperado para a extração de RNA. Em seguida, foram adicionados 200 μL de clorofórmio gelado (5:1 Tri-reagent/Clorofórmio) e as amostras foram centrifugadas novamente ($12\ 000 \times g$ por 15 min a 4°C). O sobrenadante foi coletado e adicionado 500 μL de isopropanol e novamente centrifugado ($12\ 000 \times g$ por 15 min a 4°C).

Após eliminar o sobrenadante, o sedimento (*pellet*) foi lavado com etanol 75%, centrifugado ($12\ 000 \times g$ por 10 min a 4°C) e diluído em água contendo 1% de dietilpirocarbonato (DEPC). As amostras foram tratadas com DNase RNase-livre de RQ1 (Promega) à temperatura ambiente (25°C) durante 60 min e a 10 min a 65°C . Em seguida, as amostras (90 μL) foram precipitadas utilizando 10 μL acetato de sódio (3 M, pH 5,2) e 100 μL de isopropanol. Depois da centrifugação a $12\ 000 \times g$ durante 10 min a 4°C , os sedimentos foram lavados com 500 μL de etanol 75%, secadas e solubilizadas em água contendo 1% de DEPC. A PCR para o gene da β -actina foi realizado antes da síntese de cDNA para verificar a ausência de contaminantes de DNA de amostras de RNA totais. A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em géis de agarose a 1,5% corado com GelRed (1:500, Biotium). A quantificação do RNA total foi realizada através do espectrofotômetro BIO-5000-BI (KASUAKI) e as amostras com valores de $260/280$ e $260/230 \geq 1,8$ foram consideradas aceitáveis para a síntese de cDNA.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando 1 μg de RNA total de cada amostra e o kit GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega). A reação de transcrição reversa consistiu de 4 μL de *GoScript™ 5X Reaction Buffer*, *GoScript™ Reverse transcriptase* (160 U), 0,5 μM de cada dNTP, 0,5 μg de iniciador Oligo(dT)₁₅, 2,5 mM de MgCl_2 e *ribonuclease inhibitor* (20 U). Previamente, o RNA e o Oligo(dT)₁₅ foram

misturados, incubados a 70°C por 5 min e imediatamente colocadas em gelo por 5 min. Após este período, os demais componentes foram adicionados. As reações foram incubadas a 25°C por 5 min, a 42°C por 60 min e a 70°C durante 15 min.

5.9.2. RT-qPCR

Foi realizado um protocolo de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) de dois passos para medir os níveis de transcritos dos genes *Gpx1* (glutathiona peroxidase 1), *Gpx4* (glutathiona peroxidase 4), e *Gclc* (glutamil-cisteína ligase subunidade catalítica) e de outros genes descritos na Tabela 3. As reações de qPCR foram realizadas usando as placas de 96 poços (Axygen), o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) e o equipamento 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). As sequências de iniciadores dos genes desenhados para análises de qPCR e de outros estudos científicos usados no presente estudo são mostradas na Tabela 3. A eficiência dos iniciadores foi calculada a partir de diluições em série (1/10, 1/20, 1/40; 1/80 e 1/160) de um *pool* de cDNA de acordo com a equação $E = 10^{-(1/\text{slope})}$. A reação qPCR (10 µL) continha 5 µL de *Master mix*, 1 µL de cDNA diluído (1/10), 0,3 µL de cada iniciador (10 µM), 0,1 µL de carboxi-X-rodamina (CXR) e 3,3 µL de água-DEPC. As condições de ciclagem qPCR foram as seguintes: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 40 ciclos de amplificação (15 seg a 95 °C e 1 min a 60°C). No final dos ciclos, foi submetido a uma curva de dissociação (15 seg a 95°C, 15 seg a 60°C e 15 seg a 95°C). O controle negativo de cada gene, utilizando água no lugar de DNA, foi incluído em cada placa de qPCR para determinar a ausência de contaminação. Os valores de Cq foram analisados usando o software SDS v2.4 (Applied Biosystems). Os níveis de transcritos de *Gpx1*, *Gpx4*, *Gclc* e de outros genes descritos na Tabela 3 foram normalizados usando o gene *β-act* e calculados usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A quantificação do número de cópias de *Gpx4* citosólica e mitocondrial de cada amostra foi realizada usando valores de Cq a partir das curvas de plasmídeos (10^8 a 10^4 cópias) contendo as isoformas *Gpx4* e o gene *Gapdh* (BORCHERT et al., 2006). Um valor de *cutoff* ≥ 1.5 e diferenças estatísticas entre grupos foram considerados para determinar significância biológica usando análises de níveis de transcritos por qPCR (EDMUNDS et al., 2014).

Tabela 3. Sequências de iniciadores de genes usados nos experimentos de RT-qPCR.

Gene		Sequências de iniciadores (5' - 3')	Tamanho de amplificado (pb)	Ta (°C)	Referência
Símbolo	Nome				
<i>Gpx1</i>	<i>Glutaciona peroxidase 1</i>	CTCACCCGCTCTTTACCTTC CAAAGTTCACAGCAATGTGC	129	60	Quispe et al., 2018
<i>mtGpx4</i>	<i>Glutaciona peroxidase 4 mitocondrial</i>	CCGCCGAGATGAGCTGG GTCGATGTCCTTGGCTGAG	158	60	Casañas-Sanchez et al., 2014; Quispe et al. 2018
<i>mcGpx4</i>	<i>Glutaciona peroxidase 4 mitocondrial e citosólica</i>	GTCTGGCAGGCACCATGT GTCGATGTCCTTGGCTGAG	83	60	Quispe et al. 2018
<i>Gclc</i>	<i>Subunidade catalítica da glutamato cisteína ligase</i>	TTACCGAGGCTACGTGTCAGAC TGTCGATGGTCAGGTCGATGTC	200	62	Kurauchi et al., 2012
<i>HO-1</i>	<i>Heme oxigenase 1</i>	CAGCCCCACCAAGTTCAAA TCAGGTGTCATCTCCAGAGTGTTCC	63	60	Tighe et al., 2011
<i>Cat</i>	<i>Catalase</i>	TGAAGCAGTGAAGGAGCAG AGTGTGCCATCTCGTCAGTG	156	62	Nesta tese
<i>Sod2</i>	<i>Superoxido dismutase 2</i>	GACCTGCCTTACGACTATG GGTGGCGTTGAGATTGTTC	108	60	Nesta tese
<i>Prdx2</i>	<i>Peroxirredoxina 2</i>	CTTTGTGTTGCCACGGAG AGACCCCTGTAAGCAATGCC	244	62	Nesta tese
<i>Prdx3</i>	<i>Peroxirredoxina 3</i>	AAGGCGTTCAGTTGTAG CTGTGGACTTGGCTTGA	88	60	Nesta tese
<i>Prdx5</i>	<i>Peroxirredoxina 5</i>	GTGGCCTGTCTGAGCGTTAA TTCAGCCGACGATTCCAAA	170	60	Nesta tese
<i>Txnrd2</i>	<i>Tiorredoxina redutase 2</i>	GATCAAGTGTGGGGCTTCA GTGTCCTTAGCTCAGCAGGG	164	60	Quispe et al., 2018
<i>β-act</i>	<i>β-actina</i>	CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG TGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG	138	60	Flowers et al., 2013
<i>Gapdh</i>	<i>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase</i>	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG	153	60	Know et al. 2015

Ta: Temperatura de anelamento usado do RT-qPCR.

5.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise de variância (ANOVA) de um ou dois fatores foi realizada. Quando o valor de F foi significativo, realizou-se o teste *post-hoc* de Tukey para comparar diferenças significativas entre os grupos. O teste de Student (teste *t*) foi usado para comparar as médias em

experimentos com apenas 2 grupos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o sistema de software STATISTICA, versão 7.0. (StatSoft, Inc., 2008). Todos os gráficos foram feitos usando o software GraphPad PRISM® versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Diferenças significativas foram estatisticamente consideradas ao nível de $p < 0,05$.

6. Capítulo I:

A MODULAÇÃO DO SISTEMA ANTIOXIDANTE DA GLUTATIONA ESTÁ IMPLICADA NO EFEITO PROTETOR DO DISSELENETO DE DIFENILA CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO E DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL EM CÉLULAS NEURONAIS.

Trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram o efeito citoprotetor do (PhSe)₂ em células endoteliais (de BEM et al., 2013; HORT et al., 2014; FIUZA et al., 2015) e em macrófagos (STRALIOTTO et al., 2013) expostos a diferentes condições oxidativas. Assim, o objetivo central deste capítulo foi investigar se o (PhSe)₂ também desempenha citoproteção em células neuronais, além de estabelecer os possíveis mecanismos envolvidos. Neste contexto, foi estabelecido um modelo *in vitro* de estresse oxidativo induzido pelo tBuOOH em células neuronais hipocâmpais HT22 com o objetivo de mimetizar os efeitos deletérios de condições associadas ao estresse oxidativo e avaliar o efeito protetor do (PhSe)₂ nestas células.

1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar parâmetros de estresse oxidativo em células neuronais HT22 expostas ao tBuOOH;
- Determinar concentrações não tóxicas do (PhSe)₂ em células neuronais HT22;
- Avaliar o efeito do (PhSe)₂ em células HT22 expostas ao estresse oxidativo induzido pelo tBuOOH sobre a viabilidade celular e a geração de espécies oxidantes;
- Avaliar o efeito do (PhSe)₂ sobre a função mitocondrial em células expostas ao tBuOOH através da respirometria de alta resolução;
- Avaliar a capacidade do (PhSe)₂ em modular a atividade enzimática da GPx e a expressão gênica da *Gpx1*, *Gpx4* e *Gclc*, bem como os níveis de glutatona;
- Avaliar o efeito do ácido mercaptosuccinico (inibidor da GPx) em células tratadas com (PhSe)₂ e expostas ao tBuOOH.

1.2. RESULTADOS

1.2.1. tBuOOH INDUZ TOXICIDADE EM CÉLULAS HT22

O efeito do tBuOOH sobre a viabilidade celular foi avaliado em diferentes concentrações e tempos de exposição. As Figuras 1.1A e 1.1B apresentam o estudo de concentração-resposta após a exposição *overnight* (~ 12 h) a diferentes concentrações de tBuOOH (0-100 μM) em células HT22. Os resultados mostraram que o tBuOOH induziu um declínio significativo na redução do MTT a partir de 20 μM (Fig. 1.1A). Além disso, o tBuOOH induziu a ruptura na membrana plasmática celular (incorporação de IP) a partir de 40 μM (Fig. 1.1B). Baseando-se nesses resultados, a concentração de 40 μM de tBuOOH foi escolhida no estudo tempo-resposta (2 a 12 h). Nessa condição, as células apresentaram uma redução significativa na capacidade de reduzir o MTT a formazan após 6 h (Fig. 1.1C) e a ruptura significativa na membrana plasmática celular (aumento da incorporação de IP) após 9 h de exposição ao tBuOOH (Fig. 1.1D).

Portanto, pode-se argumentar que a viabilidade celular e a integridade da membrana plasmática celular não foram significativamente afetadas dentro das primeiras duas ou quatro horas de exposição ao tBuOOH (40 μM). Assim, essas condições foram escolhidas para investigar os mecanismos moleculares que medeiam a toxicidade induzida por tBuOOH, bem como os potenciais efeitos protetores do $(\text{PhSe})_2$.

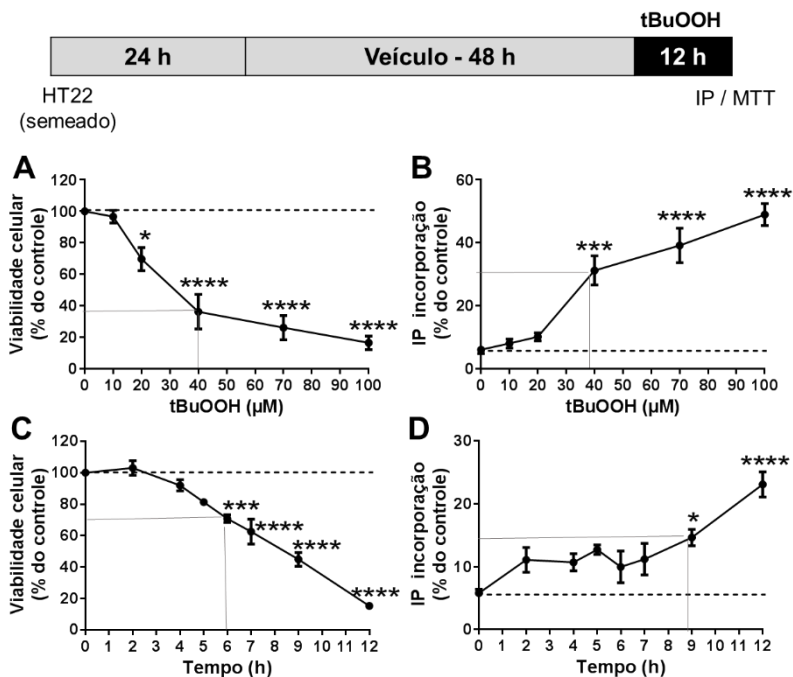


Figura 1.1. Toxicidade induzida por tBuOOH em células HT22. As células HT22 foram expostas a diferentes concentrações de tBuOOH (10-100 μM) durante ~ 12 h (A, B) ou a 40 μM durante 2 a 12 h (C, D). A viabilidade celular foi avaliada pela redução de MTT (A, C) e pela incorporação de IP (B, D). Os resultados do teste do MTT foram expressos como a porcentagem de redução do MTT em relação ao grupo de controle. Os resultados do teste de IP foram expressos como porcentagem de células tratadas com Triton 0,2% (controle positivo; 100% de morte). Os dados foram representados como média ± erro padrão da média (EPM) (A, B; n = 6) (C, D; n = 4). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ indicam diferença estatística em comparação ao grupo de controle (linha pontuada) por ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Tukey.

1.2.2. (PhSe)₂ PROTEGE AS CÉLULAS NEURONAIS HT22 CONTRA A TOXICIDADE MEDIADA POR tBuOOH

Primeiramente, foi realizado um estudo de concentração-resposta da ação do (PhSe)₂ *per se* em células neuronais. Células HT22 foram tratadas durante 48 h com concentração variando de 1 a 10 µM afim de estabelecer o limite de toxicidade (concentrações não tóxicas) deste composto. Conforme mostrado na Fig. 1.2A-B, não houve diminuição significativa na viabilidade celular em concentrações até 6 µM de (PhSe)₂, sendo que a viabilidade celular diminuiu 22% quando as células foram tratadas com 10 µM do composto, sem afetar a integridade da membrana plasmática. Baseado nesses resultados, concentrações não tóxicas de (PhSe)₂ (1 - 5 µM) foram escolhidas para avaliar seu efeito protetor contra a citotoxicidade mediada por tBuOOH. Nossos resultados mostraram um efeito protetor de (PhSe)₂ contra o tBuOOH a partir da concentração de 2 µM, a qual foi evidenciada sobre a diminuição da viabilidade celular (Fig. 1.2C) e o dano na membrana plasmática mediadas por tBuOOH (Fig. 1.2D).

1.2.3. (PhSe)₂ PREVINE A GERAÇÃO DE ESPÉCIES OXIDANTES INDUZIDAS POR tBuOOH EM CÉLULAS HT22

Considerando que o dano celular mediado por tBuOOH é comumente relacionado ao estresse oxidativo, foi investigado se (PhSe)₂ protege células HT22 da geração de espécies oxidantes (EO) induzidas por tBuOOH. A oxidação H₂DCFDA mediada por EO foi avaliada nas primeiras 2 horas após a exposição ao tBuOOH (40, 70 e 100 µM). Um aumento dependente da concentração na geração de EO foi observado após a exposição ao tBuOOH (Fig. 1.3A-B). Por outro lado, o (PhSe)₂ impediu completamente a geração de EO em células HT22 expostas a 40 µM de tBuOOH (Fig. 1.3C) e parcialmente após exposição a concentrações mais elevadas de tBuOOH (70 - 100 µM) (Fig. 1.3D-E). Além disso, o tratamento com (PhSe)₂ (2 µM) por 48 h impediu a produção de ânion superóxido mitocondrial induzido por tBuOOH após 4 h de exposição (Fig. 1.3F), o qual foi avaliada usando MitoSOX. Cabe ressaltar que (PhSe)₂ *per se* não alterou a geração de EO quando as células HT22 foram apenas tratadas com este composto (Fig. 1.3C-F).

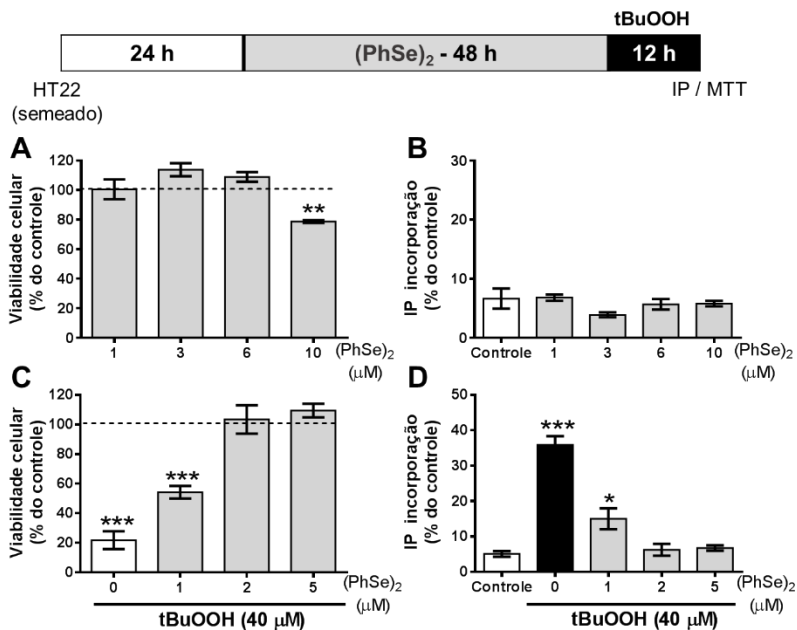


Figura 1.2. (PhSe)₂ protege as células contra a toxicidade mediada por tBuOOH. Primeiramente, as células HT22 foram tratadas com diferentes concentrações de (PhSe)₂ (1, 3, 6 e 10 μM) durante 48 h (A-B). Baseado nesses resultados, as células foram tratadas com concentrações não tóxicas de (PhSe)₂ (1; 2 e 5 μM) durante 48 h, seguidas de exposição a tBuOOH (40 μM) durante 12 h adicionais (C-D). A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT (A e C) e pela ruptura da membrana plasmática através da incorporação de IP (B e D). Os resultados do teste MTT foram expressos como porcentagem da redução do MTT em relação ao controle (linha pontilhada). Os resultados do teste de IP foram expressos como porcentagem de células tratadas com Triton 0,2% (controle positivo; 100% de morte). Os dados foram representados como média ± erro padrão da média (EPM) (A-B; n = 4, C-D; n = 6). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ indicam a diferença estatística em comparação ao grupo controle (linha pontilhada, MTT; barra branca, IP) por ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Tukey.

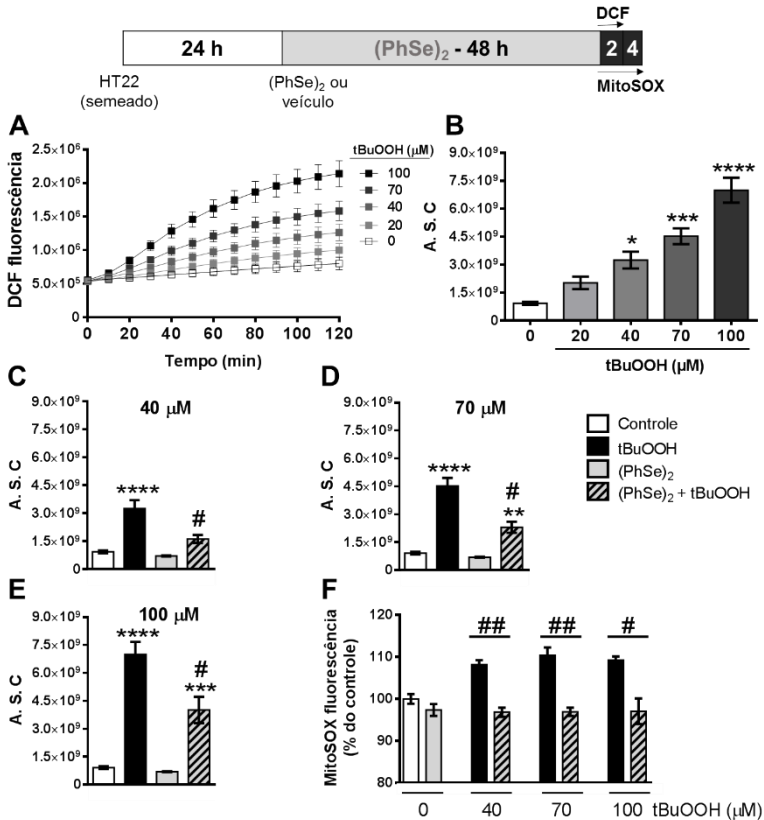


Figura 1.3. (PhSe)₂ previne a geração de EO induzida por tBuOOH. Células HT22 foram tratadas com (PhSe)₂ (2 μM) ou veículo (DMSO, 0,05%) durante 48 h. (i) Após incubação com H₂DCFDA (1 μM) durante 30 min, as células foram lavadas e expostas a tBuOOH (40, 70 ou 100 μM) em HBSS e monitorizadas durante 2 horas. Uma curva de tempo representativa da geração de EO em células HT22 tratadas somente com o veículo seguida pela exposição a diferentes concentrações de tBuOOH (40-100 μM) é mostrada na figura A. Taxa de oxidação de H₂DCF representada como áreas sobre a curva (A. S. C) foram calculadas a partir dos dados cinéticos mostrados na figura A (B). (PhSe)₂ diminuiu a geração de EO induzida por 40 μM (C), 70 μM (D) e 100 μM (E) de tBuOOH. (ii) Após incubação com MitoSOX (5 μM) durante 15 min, as células foram lavadas e expostas a tBuOOH (40, 70 ou 100 μM) em HBSS (F). A intensidade de fluorescência foi lida às 4 h. Os dados foram representados como média ± erro padrão da média (EPM) (A-E, n = 4-5; F, n=3). * *p* < 0,05; ** *p* < 0,01; *** *p* < 0,001 e **** *p* < 0,0001 indicam a diferença estatística em relação ao grupo de controle (barra branca); ## *p* < 0,01 e # *p* < 0,05, indicam a diferença

estatística entre os grupos tBuOOH e (PhSe)₂ + tBuOOH por teste t de Student (F), ANOVA de uma via (B) ou de duas vias (C-E), seguido do teste *post hoc* de Tukey.

1.2.4. (PhSe)₂ PREVINE A DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL INDUZIDA POR tBuOOH EM CÉLULAS HT22

O consumo de oxigênio mitocondrial foi avaliado por respirometria de alta resolução, em células HT22 intactas. A exposição durante 2 ou 4 h ao tBuOOH (40 µM), concentração que não afeta a viabilidade celular (Fig. 1.1C-D), causou uma diminuição significativa na taxa de consumo de oxigênio mitocondrial (OCR) (Fig. 1.4A). Nossos resultados mostraram uma diminuição significativa na capacidade respiratória máxima e na capacidade de reserva mitocondrial em células HT22 expostas ao tBuOOH em um curto período de tempo (2 h) (barra preta) (Fig. 1.4B). Após 4 h de exposição a tBuOOH (em comparação com a exposição de 2 h), a disfunção mitocondrial foi mais evidente, caracterizada por uma diminuição na OCR basal, no consumo de oxigênio ligado à síntese de ATP, na OCR máxima e na capacidade de reserva mitocondrial (barra preta) (Fig. 1.4C), alterações que foram prevenidas efetivamente pelo tratamento com (PhSe)₂ em ambos os tempos (Fig. 1.4B-C).

1.2.5. (PhSe)₂ MODULA O SISTEMA ANTIOXIDANTE DA GLUTATIONA EM CÉLULAS HT22

Os resultados obtidos a partir da Fig. 1.3 sugeriram fortemente que as células tratadas com (PhSe)₂ foram mais eficientes em neutralizar o tBuOOH. Considerando que o sistema antioxidante da glutatona desempenha um papel fundamental na detoxificação de tBuOOH, foi investigado se este sistema, particularmente a atividade GPx, os níveis GSH, a expressão do gene das isoformas *Gpx* e o gene *Gclc*, poderiam ter sido modulados por (PhSe)₂. Nossos resultados mostram um aumento significativo na atividade da glutatona peroxidase (GPx - 6,9 vezes) após 48 h de tratamento com (PhSe)₂ (Fig. 1.5A). Além disso, foi investigado se o aumento da atividade GPx induzido (PhSe)₂ poderia estar correlacionado com a expressão gênica das isoformas da enzima (*Gpx1* e *Gpx4*). Os resultados mostram que o tratamento com (PhSe)₂ após 30 h aumentou a expressão da *Gpx1* em comparação com o grupo controle (3,9 vezes, Fig. 1.5B). Por outro lado, os transcritos da *Gpx4* não foram regulados positivamente pelo tratamento com (PhSe)₂. Embora tenha sido

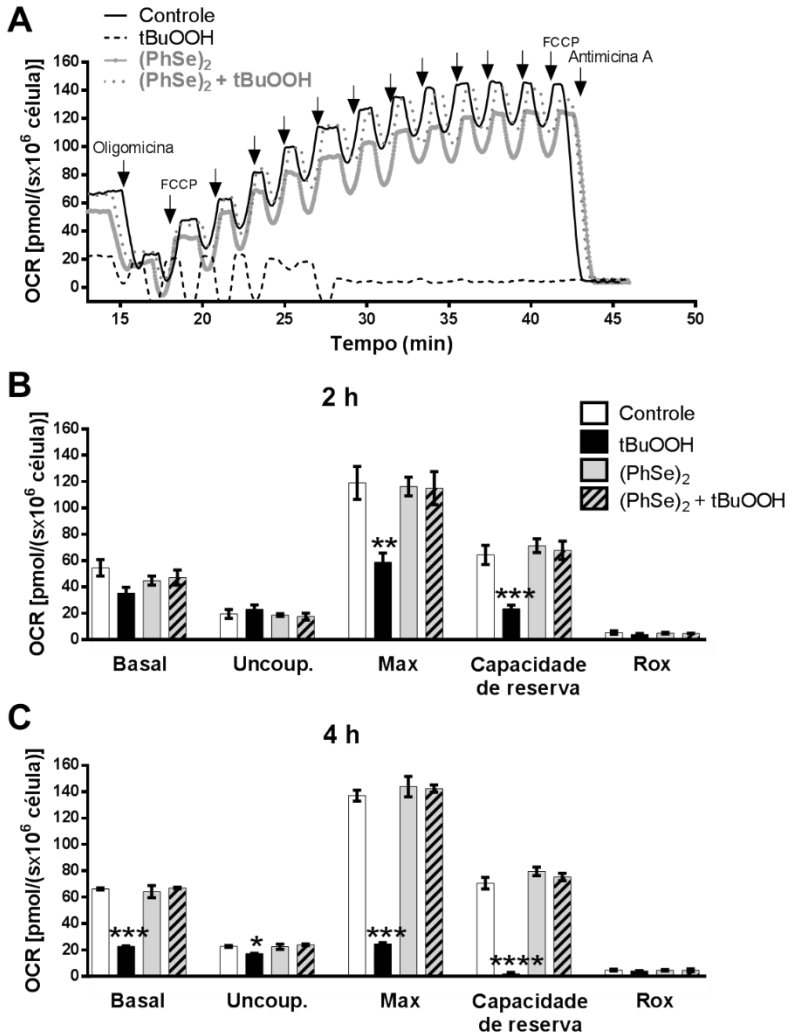


Figura 1.4. (PhSe)₂ previne a disfunção mitocondrial induzida por tBuOOH nas células HT22. Histograma representativo de respirometria realizada em células HT22 tratadas com (PhSe)₂ ou veículo por 48 h, seguidamente expostas ou não a tBuOOH (40 μM) durante 4 h no meio de cultura (A). As taxas de OCR e a capacidade de reserva mitocondrial de células HT22 expostas ou não com tBuOOH (40 μM) durante 2 h (B) e 4 h (C) foram avaliados em DMEM-5% FBS nas seguintes condições: Após a estabilização da OCR, foi calculado a OCR basal, seguidamente a inibição da ATP sintase com oligomicina (1,25 μM) para

obter a OCR desacoplada (Uncoup.), a titulação com FCCP (0,5 μ M) para obter a OCR máxima (Max) e a inibição do complexo respiratório III com antimicina A (2,5 μ M) para obter a respiração residual (Rox). Os dados foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM) (n = 4). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle (barra branca) (veículo) que não foi exposto ao tBuOOH por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey.

observado uma diminuição (22,1%) no número de cópias dos transcritos da *Gpx4* mitocondrial (Fig. 1.5D), este fato não comprometeu o efeito detoxificador do (PhSe)₂, provavelmente por esta diminuição não representar uma significância biológica. Além disso, o (PhSe)₂ causou um aumento na expressão da *Gclc* (2,3 vezes, Fig. 1.5E), cuja proteína codificada (glutamato cisteína ligase) controla o passo limitante na via de síntese de glutatona. Em concordância, (PhSe)₂ também aumentou os níveis de NPSH (62,5%) e GSH (86,2%) após 48 h de tratamento nestas células neuronais (Fig. 1.5F-G).

1.2.6. O EFEITO PROTETOR DO (PhSe)₂ ENVOLVE A MODULAÇÃO DA ATIVIDADE GPx

Para avaliar a contribuição da modulação da GPx sobre o efeito protetor do (PhSe)₂ contra a toxicidade induzida por tBuOOH em células HT22, foi realizado uma abordagem experimental usando ácido mercaptosuccínico (MS), um inibidor potente da enzima GPx (CHAUDIERE; WILHELMSSEN; TAPPEL, 1984). As células HT22 foram tratadas com (PhSe)₂ (2 μ M) na presença ou ausência de MS (5 mM), seguido da exposição ao tBuOOH (40, 70 ou 100 μ M). Primeiro, demonstramos que o MS causou uma diminuição significativa (~ 50%) na atividade GPx nas células tratadas com (PhSe)₂ (Fig. 1.6A). Essa inibição da atividade GPx repercutiu no efeito protetor do (PhSe)₂ observado anteriormente, já que o tratamento das células com MS (5 mM) reduziu o efeito protetor do (PhSe)₂ contra a toxicidade induzida por tBuOOH em células HT22 (Fig. 1.6B). Este evento foi mais evidente quando células HT22 foram expostas a concentrações mais altas de tBuOOH (70-100 μ M) (Fig. 1.6B). Embora não observamos uma inibição total da atividade GPx e uma redução total do efeito protetor do (PhSe)₂, os dados mostram que a regulação positiva da atividade GPx está envolvida na proteção de (PhSe)₂ contra a toxicidade induzida por tBuOOH nesta células neuronais.

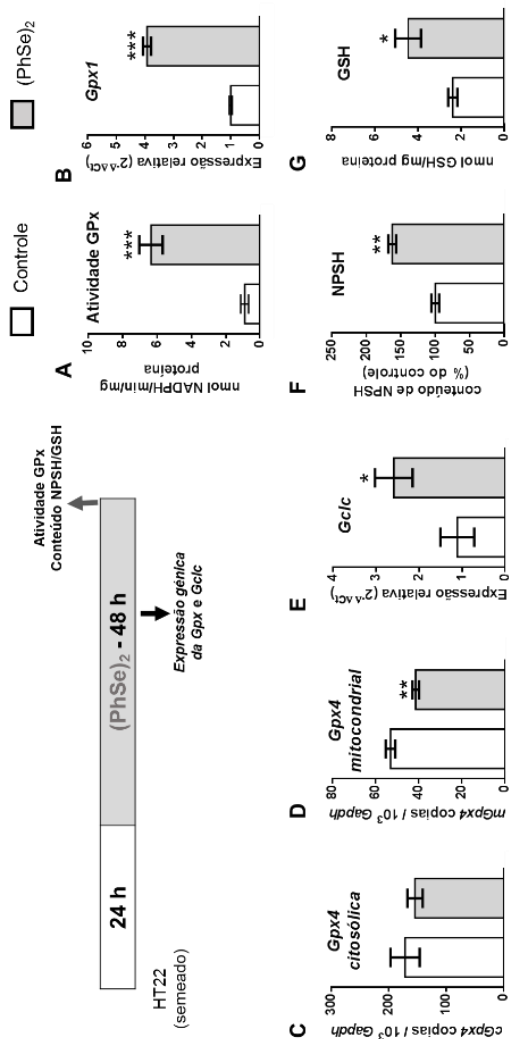


Figura 1.5. (PhSe)₂ modula o sistema antioxidante da glutatona em células HT22. As células HT22 foram tratadas com 2 μ M de (PhSe)₂ ou veículo durante 48 h para avaliar a atividade GPx (A), conteúdo de NPSH (F), conteúdo de GSH (G) ou 30 h para avaliar a expressão gênica das isoformas de *Gpx* (B, C e D) e da *Gclc* (E). A atividade GPx celular foi expressa como nanomoles de NADPH consumidos por minuto por miligrama de proteína. O conteúdo de NPSH foi expresso como porcentagem do controle. O conteúdo de GSH foi expresso como nanomoles de GSH por miligrama de proteína. Os níveis de transcritos de *Gpx1* e *Gclc* foram normalizados com o gene β -act e calculados pelo método 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}. O número de cópias dos transcritos das isoformas da *Gpx4* mitocondrial e citosólica foram calculados em relação ao número de cópias do gene *Gapdh* usando uma curva padrão de plasmídeos contendo esses genes. Os dados foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM) (A; n = 6, B-E; n = 4, F; n = 3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$, indicam diferença estatística em comparação ao grupo de controle (teste t de Student).

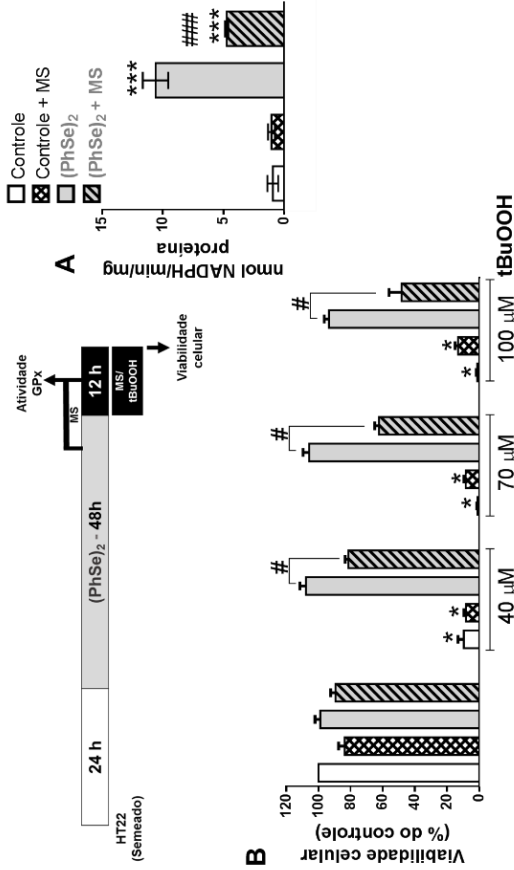


Figura 1.6. A inibição da atividade GPx reduz o efeito citoprotetor de (PhSe)₂. As células HT22 foram tratadas com (PhSe)₂ (2 μM) ou veículo durante 43 h seguido da incubação com ácido mercaptosuccínico (MS) (5 mM, inibidor de GPx) por ~ 12 h, e a atividade GPx foi avaliada. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM) (n=5). ****p* <0,001, indica a diferença estatística em comparação ao grupo controle (veículo) e ### *p* <0,001, indicam diferença estatística entre os grupos RC513 e RC513 + MS por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey (A). As células HT22 foram tratadas com (PhSe)₂ durante 48 h e expostas a tBuOOH (40, 70 ou 100 μM) durante 12 h, na presença ou ausência de MS (5 mM). A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM) (n=5). * *p* <0,0001 indica diferença estatística em relação ao grupo controle (barra branca) não exposto a tBuOOH, e # *p* <0,0001, indica a diferença estatística entre os grupos (PhSe)₂ e (PhSe)₂ + MS, ambos expostos a tBuOOH. ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey.

8. Capítulo II:

AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOPROTETOR DE UM COMPOSTO INÉDITO DERIVADO DE PROBUCOL: MODULAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM CÉLULAS NEURONAIS

Apesar do comprovado efeito benéfico do probucol no tratamento de doenças cardiovasculares, este medicamento foi retirado do mercado por diminuir os níveis plasmáticos da lipoproteína de alta densidade (HDL) e também por causar arritmias ventriculares em alguns usuários deste composto (TARDIF; GREGOIRE; L'ALLIER, 2002). O succinobucol, um derivado sintético do probucol, que parece não causar efeitos cardíacos colaterais, foi avaliado por nosso grupo de pesquisa no que se refere a seus efeitos neuroprotetores. Nestes estudos, o succinobucol foi capaz de proteger células SH-SY5Y do estresse oxidativo induzido por ácido 3-nitropropiónico (3-NP) por aumentar os níveis de GSH através da regulação positiva da atividade da GCL (COLLE et al., 2016). Assim, novos derivados do probucol estão sendo sintetizados (dentre estes, o RC513) com o intuito de aumentar sua eficiência, resgatando as já comprovadas ações benéficas do probucol e diminuindo seus efeitos colaterais. Neste sentido, o objetivo principal deste capítulo foi avaliar a possível ação citoprotetora de um novo derivado do probucol (RC513) em um modelo *in vitro* de citotoxicidade induzida por dano oxidativo em células neuronais.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar concentrações não tóxicas do RC513 em células HT22;
- Avaliar o efeito do RC513 em células HT22 expostas ao estresse oxidativo induzido pelo tBuOOH sobre a viabilidade celular e a geração de espécies oxidantes;
- Avaliar o efeito do RC513 sobre a função mitocondrial em células expostas ao tBuOOH através da respirometria de alta resolução;
- Avaliar a capacidade RC513 em modular a atividade enzimática da GPx e a expressão gênica da GPx1 e GPx4, bem como os níveis de tióis não proteicos (NPSH);
- Avaliar o efeito do ácido mercaptosuccínico, inibidor da GPx, em células tratadas com RC513 e expostas ao tBuOOH.

2.2. RESULTADOS

2.2.1. EFEITO DO RC513 EM CÉLULAS HT22 EXPOSTAS AO tBuOOH

O tBuOOH é usado como desafio oxidativo em estudos experimentais *in vitro* devido à sua capacidade de gerar espécies oxidantes (TAFFESS et al., 1987) e causar dano oxidativo a diversos sistemas biológicos, incluindo células neuronais (KANG; BAEK; KIM, 2005). No presente estudo, foram observados que tanto a diminuição da viabilidade celular (Fig. 2.1A) quanto o aumento da ruptura da membrana plasmática induzido por tBuOOH (Fig. 2.1B) apresentaram um efeito dependente da concentração do oxidante. Quando as células foram expostas a 40 μM de tBuOOH durante diferentes períodos, observou-se um perfil dependente do tempo com efeitos significativos na viabilidade celular (Fig. 2.1C) e ruptura da membrana plasmática (Fig. 2.1D) em 6 e 9 h, respectivamente. Por outro lado, o tratamento das células HT22 com concentrações não tóxicas de RC513 foi capaz de prevenir (Fig. 2.2A-B) completamente a diminuição da viabilidade (Fig. 2.2C) e o aumento da ruptura da membrana plasmática induzido por tBuOOH (Fig. 2.2D).

2.2.2. EFEITO DO RC513 SOBRE A GERAÇÃO DE ESPÉCIES OXIDATIVAS INDUZIDA POR tBuOOH EM CÉLULAS HT22

Como a toxicidade do tBuOOH é classicamente relacionada ao estresse oxidativo, foi avaliado se RC513 protegeria as células HT22 da geração de espécies oxidantes (EO) induzidas por tBuOOH (Fig. 2.3A). Nossos resultados mostraram que o tratamento com RC513 (2 μM) por 48 h impediu totalmente a geração de EO induzida por 40 μM de tBuOOH (Fig. 2.3B) e parcialmente em concentrações mais altas (70 μM e 100 μM) de tBuOOH (Fig. 2.3C-D). Além disso, nossos resultados usando MitoSOX, uma sonda fluorescente que avalia a produção de superóxido mitocondrial, mostraram que o tratamento com RC513 (2 μM) durante 48 h impediu a geração de superóxido induzida por todas as concentrações de peróxido testadas (40, 70 e 100 μM) (Fig. 2.3E-G). Cabe ressaltar que o composto RC513 *per se* não induziu a geração de EO.

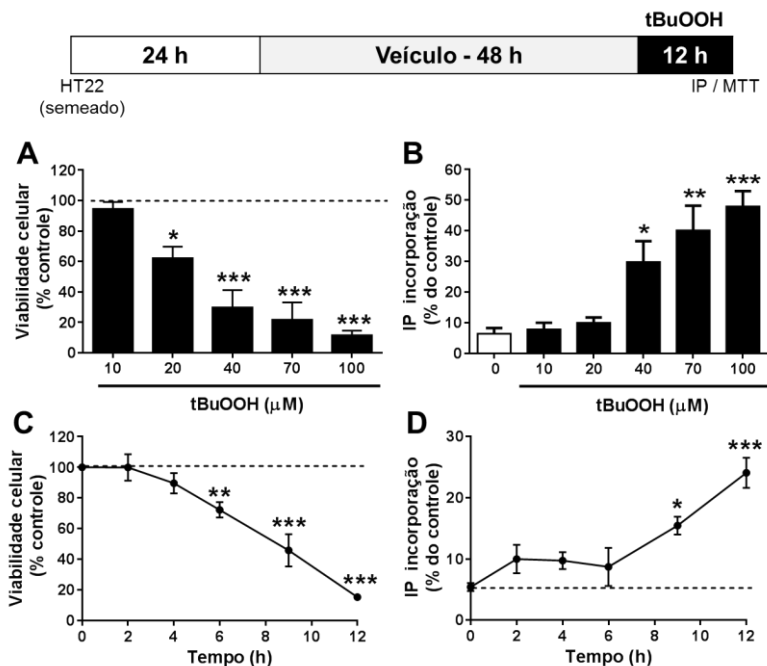


Figura. 2.1. Efeitos dependentes da concentração e do tempo de exposição ao tBuOOH sobre a viabilidade celular de células HT22. As células HT22 foram expostas a diferentes concentrações de tBuOOH (10-100 μM) durante 12 h (A, B) ou 40 μM de 0 a 12 h (C, D). A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT (A, C) e a ruptura da membrana plasmática pela incorporação de IP (B, D). Os resultados do teste MTT foram expressos como porcentagem da redução do MTT em relação ao grupo controle. Os resultados do teste de IP foram expressos como porcentagem de células tratadas com Triton 0,2% (controle positivo; 100% de morte). Os dados foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM) (A, B; n = 4) (C, D; n = 3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; e *** $p < 0,001$ indicam a diferença estatística em comparação ao controle (linha pontilhada, MTT; barra branca e/ou linha pontilhada, IP) por ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Tukey.

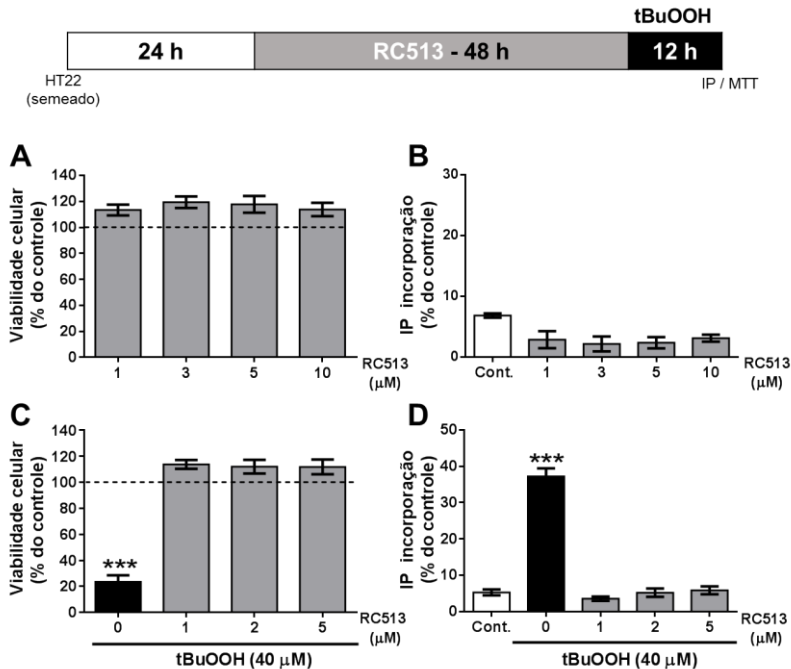


Figura 2.2. Efeitos do RC513 contra a toxicidade induzida por tBuOOH em células HT22. Determinação das concentrações não tóxicas do RC513 (A, B). As células HT22 foram tratadas com diferentes concentrações do RC513 (1, 3, 5 e 10 μM) durante 48 h, seguido dos ensaios de viabilidade celular. RC513 preveniu a diminuição da viabilidade celular induzida por tBuOOH (C, D). As células foram tratadas com RC513 (1, 2 e 5 μM) por 48 h, seguida da exposição ao tBuOOH (40 μM) durante 12 h. A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT (A e C) e pela ruptura da membrana plasmática através da incorporação de IP (B e D). Os resultados do teste MTT foram expressos como porcentagem da redução do MTT em relação ao controle (linha pontilhada). Os resultados do teste de IP foram expressos como porcentagem de células tratadas com Triton 0,2% (controle positivo; 100% de morte). Os dados foram representados como média ± erro padrão da média (EPM) (A, B; n = 3; C, D; n = 6). *** $p < 0,001$ indicam a diferença estatística em comparação ao grupo controle (linha pontilhada, MTT; barra branca, IP) por ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Tukey.

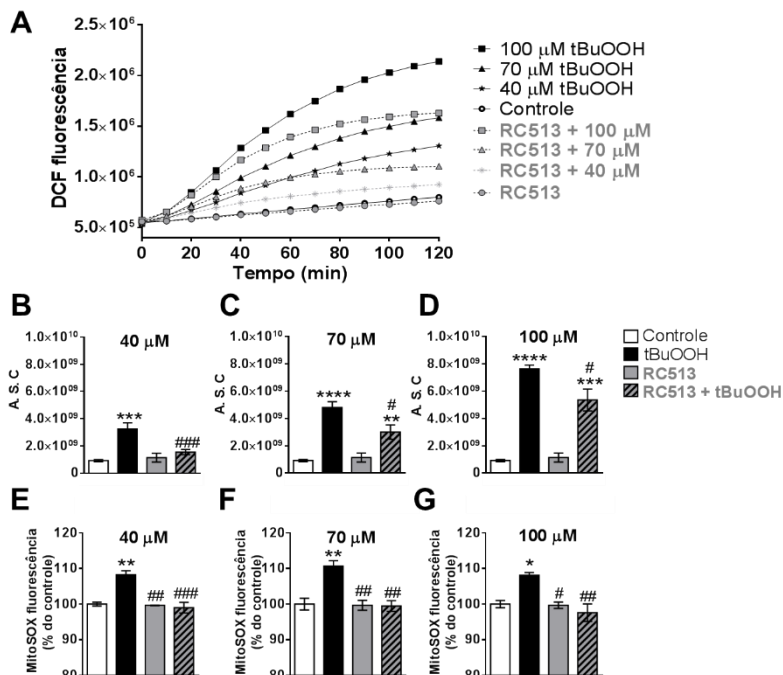


Figura 2.3. Efeitos protetores do RC513 contra a geração de EO induzida por tBuOOH. Células HT22 foram tratados com RC513 (2 μM) ou veículo (DMSO, 0,05%) durante 48 h. (i) Após incubação com H_2DCFDA (1 μM) durante 30 min, as células foram lavadas e expostas a tBuOOH (40, 70 ou 100 μM) em HBSS. A intensidade de fluorescência, o que representa a oxidação de H_2DCF por EO, foi monitorado cineticamente por 2 h. Uma curva de tempo representativa da geração de EOs em células HT22 tratadas com veículo ou com RC513 seguida pela exposição de diferentes concentrações de tBuOOH (40-100 μM) (A). Taxa de oxidação de H_2DCF . Área sob a curva (A.S.C) calculada a partir da cinética mostrada em A. RC513 diminuiu a geração de EO induzida por 40 μM (B), 70 μM (C) e 100 μM (D) de tBuOOH. (ii) Após incubação com MitoSOX (5 μM) durante 15 min, as células foram lavadas e expostas a tBuOOH (40, 70 ou 100 μM) em HBSS. A intensidade de fluorescência foi lida às 4 h. Os dados foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM) (A-D, n = 4-5; E-G, n=3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ indicam a diferença estatística em relação ao grupo de controle (barra branca) e ### $p < 0,001$; ## $p < 0,01$ e # $p < 0,05$, indicam a diferença estatística entre os grupos tBuOOH e RC513 + tBuOOH por ANOVA de duas vias, seguido do teste *post hoc* de Tukey.

2.2.3. EFEITO DO RC513 SOBRE A FUNÇÃO MITOCONDRIAL DE CÉLULAS HT22 EXPOSTAS AO tBuOOH

Considerando que a disfunção mitocondrial representa uma consequência comum do estresse oxidativo, foi avaliado o potencial efeito deletério do tBuOOH (40 μ M) sobre a função mitocondrial (respiração celular) de células neuronais HT22 (Fig. 2.4A). Nossos resultados mostram que a exposição por 2 h ao tBuOOH causou diminuição significativa na capacidade respiratória máxima mitocondrial de células HT22 a qual foi prevenida pelo tratamento prévio com RC513 ($p < 0,05$, Fig. 2.4B). Uma disfunção mitocondrial mais evidente foi observada após exposição mais longa ao tBuOOH (4 h). O desafio oxidante causou uma profunda diminuição da respiração basal (OCR basal) e na OCR máxima (máxima respiração mitocondrial), eventos alterados que foram prevenidos efetivamente pelo tratamento com RC513 ($p < 0,001$, Fig. 2.4C).

2.2.4. EFEITO DO RC513 SOBRE A ATIVIDADE E EXPRESSÃO DE RNAm DA GPx, E SOBRE OS NÍVEIS DE NPSH NAS CÉLULAS HT22

Considerando o efeito benéfico do RC513 na prevenção da geração de EO induzidas por tBuOOH em células HT22 (Fig. 2.3) e tendo em vista que a glutathiona peroxidase (GPx) representa uma enzima chave na detoxificação do tBuOOH (TOPPO et al., 2009), os efeitos do tratamento com RC513 sobre a atividade GPx e a expressão dos genes *Gpx1* e *Gpx4* e sobre os níveis de NPSH foram investigados. Os resultados mostram que o RC513 aumentou a atividade GPx (10 vezes, Fig. 2.5A) em células HT22 após 48 h de tratamento em comparação com o grupo controle. Além disso, o tratamento com RC513 aumentou os níveis dos transcritos da *Gpx1* (4,4 vezes, Fig. 2.5B) 30 h após o tratamento em comparação com o grupo controle, enquanto os transcritos da *Gpx4* citosólica não foram regulados positivamente pelo tratamento com RC513 (Fig. 2.5C). Enquanto, os transcritos da *Gpx4* mitocondrial foram diminuídos em 22% (Fig. 2.5D). Não foram observadas alterações significativas nos níveis de NPSH (Fig. 6E), cuja composição consiste em aproximadamente 90% de glutathiona (DELUCIA et al., 1975).

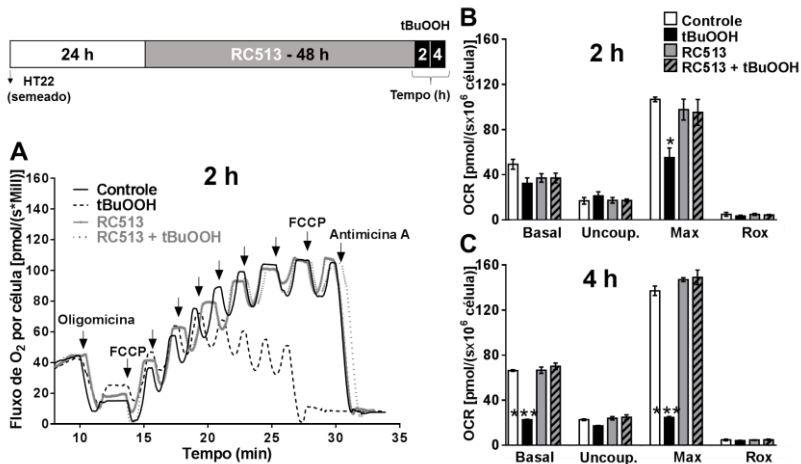


Figura 2.4. Efeito do RC513 nas taxas de consumo de oxigênio (OCR) nas células HT22. Histograma representativo de respirometria realizada em células HT22 tratadas com RC513 (2 μ M) durante 48 h seguidamente expostas ou não ao tBuOOH (40 μ M) durante 2 h no meio de cultura (A). As taxas de OCR mitocondrial em células HT22 expostas ou não com tBuOOH (40 μ M) durante 2 h (B) e 4 h (C) foram avaliadas em DMEM-5% SBF nas seguintes condições: Após a estabilização da OCR, foi calculado a OCR desacoplada (Uncoup.), a titulação com FCCP (0,5 μ M) para obter a OCR máxima (Max) e a inibição do complexo respiratório III com antimicina A (2,5 μ M) para obter a respiração residual (Rox). Os dados foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM) (n = 3-4). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle (barra branca) (veículo) que não foi exposto a tBuOOH por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey.

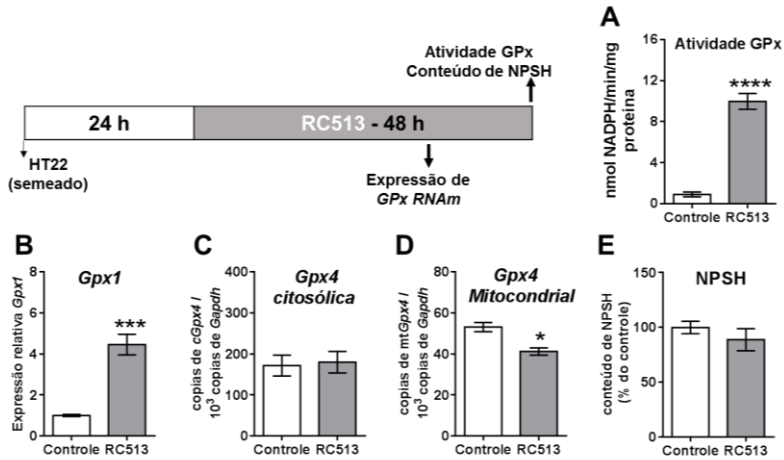


Figura 2.5. Efeito de RC513 no sistema de defesa antioxidante dependente de glutatona. Células HT22 foram tratadas com 2 μ M de RC513 ou veículo durante 48 h (A e E) ou 30 h (B-D). A atividade GPx celular (A) foi expressa como nanomoles de NADPH consumidos por minuto por miligrama de proteína. O conteúdo de NPSH (E) foram expressos como porcentagem do controle. Os níveis de transcritos de *Gpx1* (B) foram normalizados com o gene β -act e calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. O número de cópias dos transcritos da isoforma citosólica (C) e mitocondrial (D) da *Gpx4* foram calculadas em relação ao número de cópias de *Gapdh*, usando uma curva padrão de plasmídeos contendo esses genes. Os dados foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM) (A, n = 6; B-D, n = 4; E, n = 3). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; e **** $p < 0,0001$, indicam a diferença estatística com o grupo controle (teste t de Student).

2.2.5. O ÁCIDO MERCAPTOSUCCÍNICO (MS) REDUZ O EFEITO PROTETOR DE RC513 EM CÉLULAS HT22

Baseado nos resultados acima mencionados (especialmente na Fig. 2.3 e Fig. 2.5), hipotetizou-se que a proteção induzida por RC513 contra o tBuOOH pode estar relacionada, pelo menos em parte, com seus efeitos estimuladores sobre GPx. Para testar esta hipótese, investigou-se se o ácido mercaptosuccínico (MS), um inibidor da atividade de GPx, poderia anular o efeito protetor induzido por RC513 em células HT22 expostas a tBuOOH. Como observado anteriormente, o RC513 induziu um aumento significativo da atividade GPx em células HT22 e MS reduziu significativamente (aproximadamente 80%) esse efeito (Fig. 2.6A). O tratamento com MS, que não afetou a viabilidade celular *per se*, mas diminuiu significativamente a proteção induzida por RC513 nas três concentrações de tBuOOH testadas (Fig. 2.6B-C).

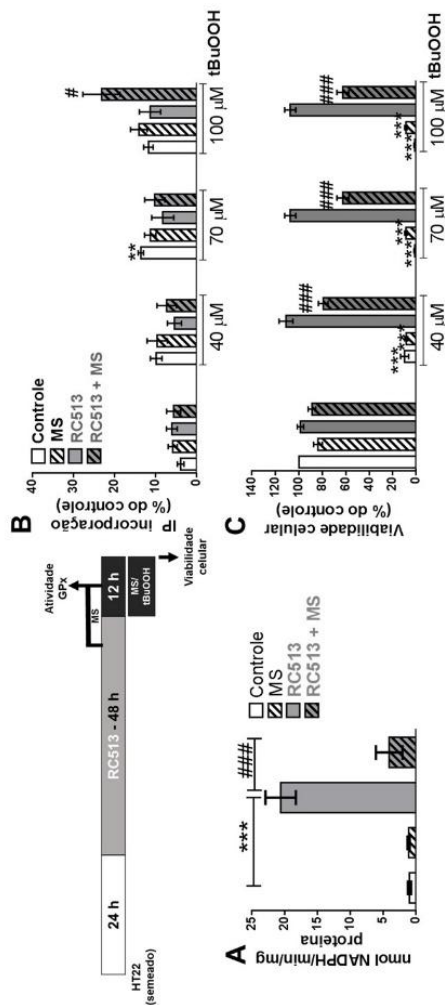


Figura 2.6. A inibição da glutatona peroxidase reduz a proteção induzida por RC513 em células HT22 expostas a tBuOOH. As células HT22 foram tratadas com RC513 (2 µM) ou veículo durante 43 h seguido de incubação com ácido mercaptosucínico (MS) (5 mM, inibidor de GPx) por ~ 12 h, e a atividade GPx foi avaliada. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM) (n=3). *** $p < 0,001$, indicam diferença estatística em comparação ao grupo controle (veículo) e ### $p < 0,001$, indicam diferença estatística entre os grupos RC513 e RC513 + MS por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey (A). As células HT22 foram tratadas com RC513 ou veículo durante 48 h e expostas ao tBuOOH (40, 70 e 100 µM) durante 12 h, na presença ou ausência de MS (5 mM). Em seguida, os ensaios de viabilidade [incorporação de IP (B) e redução do MTT (C)] foram realizados. Os resultados foram expressos como porcentagem do controle (veículo) no teste do MTT e como porcentagem de células tratadas com Triton 0,2% (controle positivo e 100 % de morte) no teste da incorporação de IP. Cada barra representa a média ± erro padrão da média (EPM) (n=5). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, indicam diferença estatística em relação ao grupo controle (barra branca) não exposto a tBuOOH, e # $p < 0,05$, e ## $p < 0,001$, indicam a diferença estatística entre o grupo RC513 e RC513 + MS, ambos expostos a tBuOOH. ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey foram realizadas.

8. Capítulo III:

ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO PROTETOR DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO (PhSe)₂ E RC513 EM CÉLULAS NEURONAIS HT22 EXPOSTAS À OXIDANTES

O terceiro capítulo desta tese tem como objetivo comparar os efeitos protetores dos compostos (PhSe)₂ e RC513, além de proporcionar maiores conhecimentos sobre os mecanismos de proteção de cada um destes compostos. Nos capítulos I e II, foi mostrado que ambos os compostos apresentam propriedades protetoras na concentração de 2 µM por induzir o incremento da atividade GPx em 48 h, o qual correlacionou-se com a expressão gênica da GPx1, observada em 30 h de tratamento. Salienta-se que não foi observada modulação positiva dos tratamentos acima-mencionados no nível de transcritos da GPx4. Neste capítulo, objetivou-se realizar um estudo temporal investigando os efeitos dos compostos (PhSe)₂ e RC513 sobre a atividade e expressão gênica da GPx, assim como seus efeitos sobre outros genes relacionados com defesas antioxidantes, com o intuito de comparar o início da proteção induzida por ambos os compostos. Além disso, avaliou-se os possíveis efeitos protetores de ambos os compostos quando presentes em uma concentração menor que aquela estudada previamente, a fim de comparar a eficácia protetora dos mesmos. Para isto, as células HT22 foram expostas a diferentes agentes oxidantes/estressores como tBuOOH, glutamato, SIN-1 e MeHg.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito temporal do tratamento com (PhSe)₂ ou RC513 sobre a atividade e a expressão gênica da GPx, assim como seus efeitos sobre outros genes antioxidantes;
- Avaliar a proteção induzida pelo tratamento com os compostos em células HT22 expostas a concentrações tóxicas de tBuOOH;
- Analisar o efeito dos compostos sobre os níveis de GSH, NPSH e transcritos de *Gclc* nas células HT22;
- Avaliar o efeito diferencial no tempo de pré-tratamento com os compostos orgânicos de selênio em células HT22 expostas a tBuOOH, sobre a viabilidade celular;

- Avaliar e comparar o efeito de duas concentrações (0,5 μM e 2 μM) do $(\text{PhSe})_2$ e RC513 sobre a viabilidade celular e atividade de GPx em células HT22;
- Avaliar o efeito protetor dos compostos orgânicos de selênio em células expostas ao glutamato e SIN-1;
- Investigar se os compostos orgânicos de selênio protegem contra a toxicidade induzida por MeHg nas células HT22;
- Avaliar o efeito do MeHg sobre atividade de GPx em células HT22 pré-tratadas com os compostos orgânicos de selênio.

3.2. RESULTADOS

3.2.1. MODULAÇÃO POSITIVA TEMPO-DEPENDENTE DA ATIVIDADE GPx E DA EXPRESSÃO GÊNICA DA GPx1 APÓS TRATAMENTO COM $(\text{PhSe})_2$ E RC513

Os resultados demonstraram que existe uma modulação positiva da atividade de GPx após o tratamento com ambos os compostos (quando sua concentração é 2 μM) em células HT22 e que este efeito é dependente do tempo de pré-tratamento (Fig. 3.1A e C). De fato, observou-se que a expressão gênica de *Gpx1* e a atividade GPx aumentaram a partir de 6 h. No entanto, a atividade da GPx após o tratamento com RC513 teve diferenças significativas em 6 h e 30 h, assim como também foi observado uma tendência de aumento no tempo 48 h, em comparação ao $(\text{PhSe})_2$. Em relação ao gene *Gpx4*, não foram observadas diferenças significativas na expressão temporal após os tratamentos em relação ao controle (Fig. 3.1B).

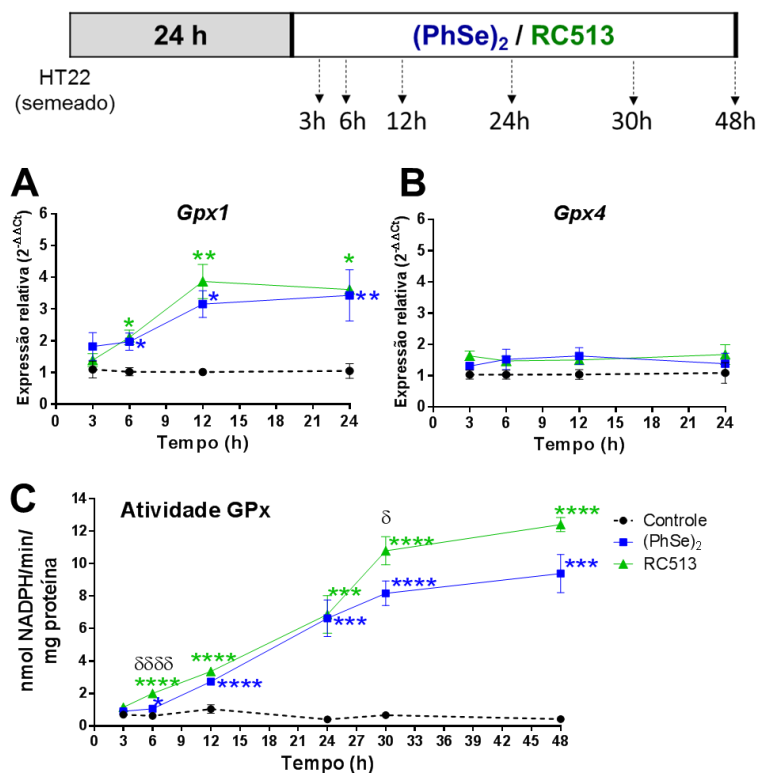


Figura 3.1. Efeito temporal do (PhSe)₂ e RC513 na expressão gênica da GPx1, GPx4 e atividade da GPx em células HT22. Células HT22 foram pré-tratadas com 2 μ M de (PhSe)₂, RC513 ou veículo durante 3 h a 24 h (A-B) e 3 h a 48 h (C). Os níveis de transcritos de *Gpx1* (A) e *Gpx4* (B) foram normalizados com o gene β -act e calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. A atividade GPx celular (C) foi expressa como nanomoles de NADPH consumidos por minuto por miligrama de proteína. Os dados foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM) (A-B, n = 4; C, n = 6). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; e **** p < 0,0001, indicam a diferença estatística em comparação ao controle (linha pontuada) e δ p < 0,05 e $\delta\delta\delta\delta$ p < 0,0001 entre (PhSe)₂ e RC513, por ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Tukey.

3.2.2. RC513 e (PhSe)₂ PROTEGEM AS CÉLULAS HT22 DESAFIADAS COM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE tBuOOH.

No resultado do Capítulo I e II, mostramos que ambos compostos induziram um aumento da atividade GPx (Fig. 1.5A e 2.5A) e foram capazes de proteger as células HT22 da toxicidade inducida por 40 μ M de tBuOOH (Fig. 1.2C-D; Fig 2.2C-D). Portanto, foi avaliado se o aumento da atividade GPx, observada em 48 h, poderia proteger as células HT22 de altas concentrações de tBuOOH (até 600 μ M). Foi observado que a partir da concentração 70 μ M de tBuOOH a perda da viabilidade foi ~100%, por outro lado, ambos compostos protegeram significativamente até a concentração de 400 μ M de tBuOOH, mantendo a viabilidade celular maior a 50% (Fig. 3.2A). Um estudo prévio demonstrou que a enzima GPx1 protege contra as oxidações induzidas por peroxinitrito, por apresentar propriedades redutoras contra este peróxido (SIES et al., 1997). Neste contexto, no presente trabalho, foi avaliado se o aumento da atividade GPx induzida pelos compostos (PhSe)₂ e RC513 poderia também proteger as células HT22 frente a outro estressor como o SIN-1, um doador de peroxinitrito. Os resultados mostram que o SIN-1 (1 mM) diminui a viabilidade celular para 82% (**p < 0,01), e a viabilidade das células pré- tratadas com RC513 se manteve em 95% e com (PhSe)₂, em 90 %. Por outro lado, SIN-1 teve um efeito mais tóxico na concentração 2 mM, reduzindo a viabilidade celular a 25% dos níveis basais do controle (****p < 0,0001); e ambos os compostos protegeram as células mantendo a viabilidade celular em torno de 80 % (Figura 3.2B).

3.2.3. (PhSe)₂ AUMENTA OS NÍVEIS DE GSH, NPSH E TRANSCRITOS DE *Gclc* NAS CÉLULAS HT22, EM CONTRASTE AO RC513

Algumas diferenças na resposta induzida por ambos os compostos foram observadas: o pré-tratamento com (PhSe)₂ incrementou os níveis de GSH e NPSH em mais de 60%; no entanto, o pré-tratamento com RC513 não mostrou este efeito, o qual foi confirmado por duas metodologias distintas (Fig. 3.3A-B). Com o intuito de avaliar se o aumento de GSH poderia ser relacionado à expressão gênica da GCL, que codifica uma enzima chave da síntese de glutatona, foi realizado um estudo temporal sobre a expressão desse gene. Além disso, foi hipotetizado que existem diferenças na expressão gênica da GCL após o tratamento com ambos compostos. Nossos resultados mostraram uma

modulação positiva sobre a expressão da *Gclc* nas células que foram pré-tratadas com 2 μM de $(\text{PhSe})_2$, a partir de 3 h de pré-tratamento (** $p < 0,01$), mantendo-se alta inclusive até 24 h. Porém, o RC513 não teve efeito algum sobre a expressão deste gene (Fig. 3.3C), o qual corroborou com a ausência de efeito modulador do RC513 sobre os níveis de GSH (Fig. 3.3 A-B).

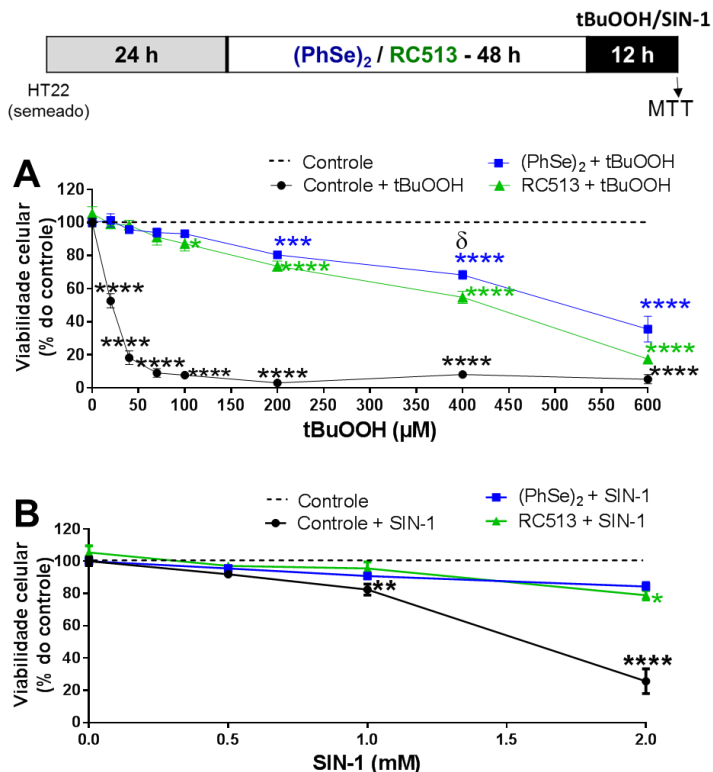


Figura. 3.2. Efeito protetor do $(\text{PhSe})_2$ e RC513 na viabilidade das células HT22 expostas ao tBuOOH ou ao SIN-1. As células HT22 foram pré-tratadas com 2 μM de $(\text{PhSe})_2$, RC513 ou veículo durante 48 h, seguidamente expostas a diferentes concentrações de tBuOOH (20 - 600 μM) (A) ou SIN-1 (0,5 - 2 mM) (B) durante 12 h. Os resultados da viabilidade celular foram expressos como porcentagem da redução do MTT em relação ao grupo controle (linha pontuada). Os dados foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM) (A, B; $n = 4$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ indicam a diferença estatística em comparação ao controle (linha pontuada) e $\delta p < 0,05$ entre $(\text{PhSe})_2$ e RC513, por ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Tukey.

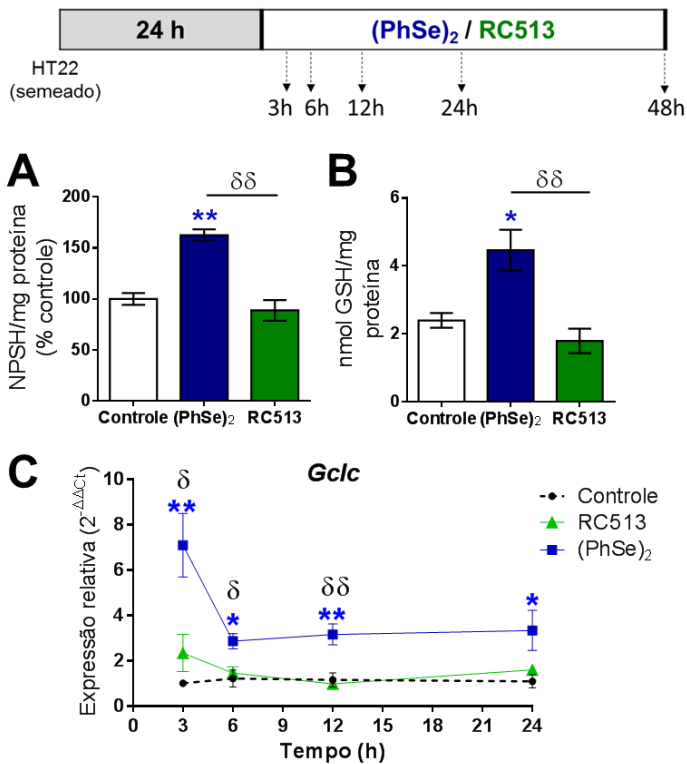


Figura 3.3. Efeito diferencial do (PhSe)₂ e RC513 sobre os níveis de NPSH, GSH, e na expressão temporal do gene *Gclc* em células HT22. Células HT22 foram pré-tratadas com 2 μM de (PhSe)₂, RC513 ou veículo durante 48 h (A e B) ou 3 h - 24 h (C). O conteúdo de NPSH (A) foram expressos como porcentagem do controle. Os níveis de GSH foi expressa como nanomoles de GSH por minuto por miligrama de proteína (B). Os níveis de transcritos de *Gclc* (C) foram normalizados com o gene *β-act* e calculados pelo método 2^{-ΔΔCT} e comparados com o veículo (linha pontuada). Os dados foram representados como média ± erro padrão da média (EPM) (A, n = 3; B, n = 4; C, n = 4). * *p* < 0,05 e ** *p* < 0,01; indicam a diferença estatística com o grupo controle, δ *p* < 0,05 e δδ *p* < 0,01 indicam a diferença estatística entre (PhSe)₂ e RC513, por ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Tukey. *Gclc*: subunidade catalítica da GCL.

3.2.4. NÍVEIS DE TRANSCRITOS DE GENES DE OUTRAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM CÉLULAS HT22 PRÉ-TRATADAS COM OS COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO

Considerando que os compostos poderiam ter ativado outros mecanismos de proteção, foi avaliada a expressão gênica de outras enzimas antioxidantes, tais como Superóxido dismutase 2 (*Sod2*), Catalase (*Cat*), Peroxirredoxina 2 (*Prdx2*), Peroxirredoxina 3 (*Prdx3*), Peroxirredoxina 5 (*Prdx5*), Tiorredoxina redutase 2 (*Txnrd2*) e Heme oxigenase (*HO-1*). Nossos resultados mostram que o tratamento com 2 μM de $(\text{PhSe})_2$ incrementou a expressão de *HO-1* em 3 h, apresentando um perfil decrescente nos tempos subsequentes (Fig. 3.4A). No entanto, não foram observadas diferenças na expressão dos outros genes (*Sod2*, *Txnrd2*, *Prdx3*) para $(\text{PhSe})_2$ e RC513, com exceção do incremento da expressão de *Prdx5* em 3 h e 6 h (Fig. 3.4F) e *Prdx2* em 6 h (Fig. 3.4D) após o pré-tratamento com RC513. A Catalase, uma enzima que catalisa a conversão de H_2O_2 para H_2O e O_2 , confinada nos peroxissomos e mitocôndrias, manteve um perfil crescente a partir de 6 h na sua expressão gênica nas células que foram somente pré-tratadas com $(\text{PhSe})_2$ (Fig. 3.4G).

3.2.5. EFEITO DIFERENCIAL NO TEMPO DE PRÉ-TRATAMENTO COM OS COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO SOBRE A VIABILIDADE CELULAR EM CÉLULAS HT22 EXPOSTAS AO tBuOOH

Com base no perfil diferencial da expressão observado para alguns genes, decidiu-se avaliar se existia alguma diferença no tempo de ação entre ambos compostos orgânicos de selênio. Para tal, as células HT22 foram pré-tratadas com 2 μM de cada composto e, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 30 h e 48 h após o pré-tratamento, o meio de cultura contendo os compostos foi retirado e um meio novo foi adicionado às células. Após ter completado 48 h de incubação, as células foram expostas a 40 μM de tBuOOH por 12 h adicionais levando a uma diminuição da viabilidade para menos do 20%. Como observado na figura 3.5, as células pré-tratadas com RC513 mostraram um efeito protetor, mantendo a viabilidade celular em 82 % (3 h), 90 % (6 h), 98 % (12 h), 109% (24 h). Por outro lado, as células pré-tratadas com $(\text{PhSe})_2$ alcançaram um efeito protetor de ~80 % somente após 30 h. Estes dados nos permite inferir que RC513 poderia ativar mais rapidamente uma resposta protetora frente ao

tBuOOH. Como esperado, ambos compostos alcançam seu o efeito protetor do 100% sobre a viabilidade em 48 h de pré-tratamento (Fig. 3.5).

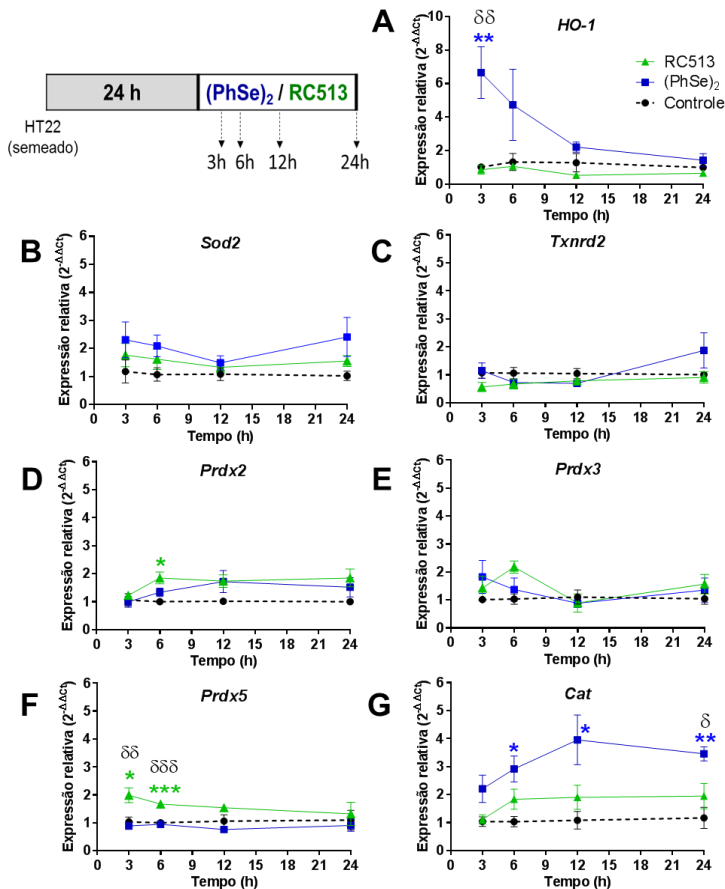


Figura 3.4. Efeito do (PhSe)₂ e RC513 sobre a expressão gênica temporal de enzimas antioxidantes em células HT22. Células HT22 foram pré-tratadas com 2 μM de (PhSe)₂, RC513 ou veículo durante 3 h - 24 h. Os níveis de transcrição de hemo oxigenase 1 (A), superóxido dismutase 2 (B), tioredoxina redutase 2 (C), peroxirredoxina 2 (D), peroxirredoxina 3 (E), peroxirredoxina 5 (F) e catalase (G) foram normalizados com o gene *Gapdh* e calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os dados foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM) (A-G= 4). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ indicam a diferença estatística com o veículo (linha pontuada) e δ $p < 0,05$; $\delta\delta$ $p < 0,01$ e $\delta\delta\delta$ $p < 0,001$ indicam a diferença estatística entre (PhSe)₂ e RC513, por ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Tukey.

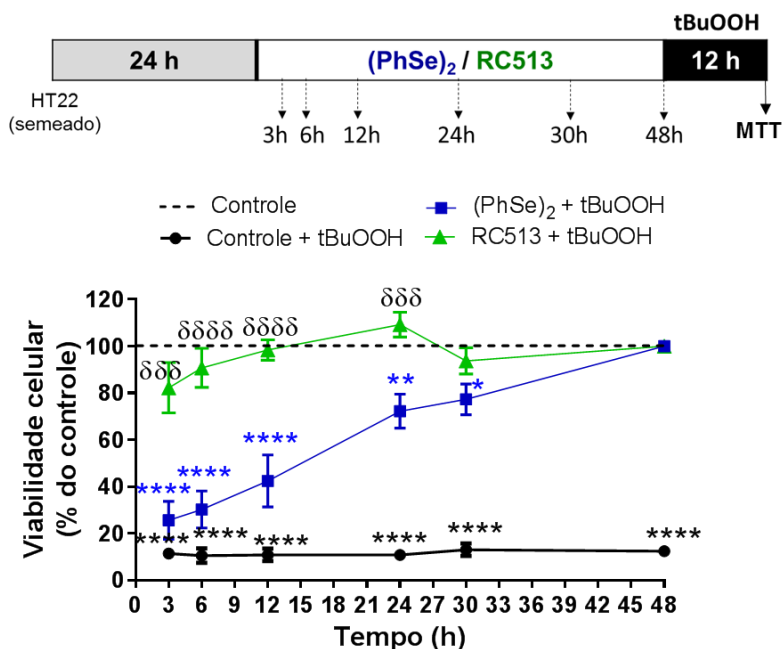


Figura. 3.5. Efeito temporal do pré-tratamento com $(\text{PhSe})_2$ e RC513 sobre a viabilidade das células HT22 expostas ao tBuOOH. As células HT22 foram pré-tratadas com 2 μM de $(\text{PhSe})_2$, RC513 ou veículo por 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 30 h e 48 h, após esse tempo o meio foi trocado por um meio novo e incubados até completar 48 h, seguidamente as células foram expostas ao tBuOOH (40 μM) durante 12 h adicionais. Os resultados da viabilidade celular foram expressos como porcentagem da redução do MTT em relação ao grupo controle (linha pontilhada). Os dados foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM) (n = 6). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ indicam a diferença estatística em comparação ao controle (veículo), $\delta\delta\delta$ $p < 0,001$ e $\delta\delta\delta\delta$ $p < 0,0001$ indicam a diferença estatística entre $(\text{PhSe})_2$ e RC513, por ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Tukey.

3.2.6. EFEITO PROTETOR DIFERENCIAL NAS CÉLULAS HT22 DEPENDENTE DA CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO

Para evidenciar melhor as diferenças do efeito protetor de ambos compostos frente ao dano induzido por tBuOOH, avaliou-se o efeito protetor em uma concentração de 0,5 μM dos compostos. Os resultados

mostraram que o RC513 tem um efeito protetor eficiente contra a perda da viabilidade celular em comparação ao $(\text{PhSe})_2$ em uma concentração de $0,5 \mu\text{M}$, depois de 48 h de pré-tratamento (Fig. 3.6A-B). Este efeito protetor observado para o RC513 foi associado à atividade GPx, o qual foi incrementada mais de 10 vezes em comparação ao grupo controle, já que $(\text{PhSe})_2$ não induziu o aumento da atividade nesta concentração (Fig. 3.6C). Como esperado, na concentração de $2 \mu\text{M}$, tanto o $(\text{PhSe})_2$ quanto RC513, induziram um aumento na atividade GPx (Fig. 3.6C), mostrado previamente nos capítulos I e II. No entanto, a atividade GPx é maior para RC513 em comparação a $(\text{PhSe})_2$, nas duas concentrações avaliadas.

3.2.7. EFEITO PROTETOR DIFERENCIAL DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO EM CÉLULAS EXPOSTAS A GLUTAMATO

Dados da literatura mostram que o glutamato é utilizado para induzir oxitose nas células HT22, por inibir o transportador cistina-glutamato (xCT), depletando a glutatona, diminuindo a atividade das enzimas dependentes de GSH, levando à morte celular desde um ponto de vista fisiológico por induzir estresse oxidativo endogenamente (FUKUI et al., 2009). Neste sentido, no presente estudo, as células HT22 foram pré-tratadas com os compostos orgânicos de selênio nas concentrações de $0,5$ e $2 \mu\text{M}$ por 24 h e, posteriormente, expostas a diferentes concentrações de glutamato (1 - 10 mM) por 24 h adicionais. Os resultados mostraram que o glutamato (5 mM) reduziu a viabilidade celular ($\sim 50 \%$) (** $p < 0,01$), o qual foi corroborado com o dano na membrana celular pelo incremento na captação de iodeto de propídeo (54%) (** $p < 0,01$). Esses eventos deletérios foram prevenidos somente pelo RC513, mas não por $(\text{PhSe})_2$ na concentração de $0,5 \mu\text{M}$, o que indica um efeito protetor mais eficiente deste derivado do probucol ao proteger as células da citotoxicidade induzida por glutamato (5 mM) (Fig. 3.7A-B). No entanto, quando presentes na concentração de $2 \mu\text{M}$, ambos os compostos protegeram de maneira similar às células contra a redução da viabilidade e do dano da membrana celular induzidas pelo glutamato, inclusive na concentração mais altas de glutamato (10 mM) (Fig. 3.7C-D).

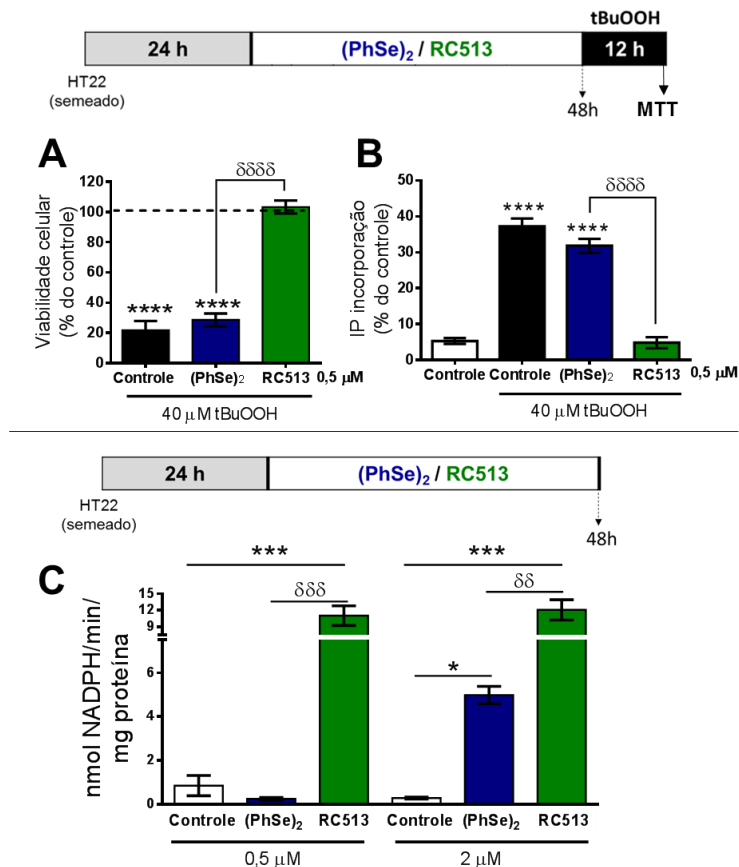


Figura 3.6. Efeito diferencial do (PhSe)₂ e RC513, dependente da concentração, sobre a viabilidade celular e atividade GPx em células HT22. As células foram pré-tratadas com (PhSe)₂, RC513 (0,5 μM) ou veículo por 48 h, seguida da exposição ao tBuOOH (40 μM) durante 12 h (A-B). A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT (A) e dano na membrana plasmática através da incorporação de IP (B). Os resultados do teste MTT foram expressos como porcentagem da redução do MTT em relação ao controle (linha pontilhada). Os resultados do teste de IP foram expressos como porcentagem de células tratadas com Triton 0,2% (controle positivo; 100% de morte). Os dados foram representados como média ± erro padrão da média (EPM) (A, B; n = 6; C; n = 4). **p* <0,05; ****p* <0,001 e *****p* <0,0001 indicam a diferença estatística em comparação ao grupo controle (linha pontilhada, MTT; barra branca, IP), ^{δδ} *p* <0,01; ^{δδδ} *p* <0,001 e ^{δδδδ} *p* <0,0001 indicam a diferença estatística entre (PhSe)₂ e RC513, por ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Tukey.

3.2.8. COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO PROTEGEM DIFERENCIALMENTE CONTRA A TOXICIDADE INDUZIDA POR MeHg EM CÉLULAS HT22.

Tendo em consideração os resultados apresentados e a relevância da glutathiona peroxidase (GPx) no efeito protetor destes compostos (apresentado nos capítulos I e II), decidiu-se avaliar a eficácia protetora de ambos os compostos frente ao MeHg, um inibidor desta enzima (FARINA et al., 2009). Neste sentido, as células foram expostas a diferentes concentrações de MeHg (10 nM - 1 000 nM). Como mostrado na figura 3.8 A-B, este toxicante reduziu a viabilidade celular em 73% ($***p < 0,001$) e causou um dano na membrana celular (23 %) ($****p < 0,0001$) a partir da concentração 100 nM; com efeitos intensificados em concentrações maiores. Com base nesses resultados, as concentrações 300 nM, 600 nM e 1 μ M foram utilizadas para um estudo tempo-resposta (3 a 24 h). Nessa condição, as células apresentaram uma redução na viabilidade celular e dano significativo na membrana plasmática celular após 24 h de exposição ao MeHg (Fig. 3.8C-D). Portanto, pode-se argumentar que a viabilidade celular e a integridade da membrana plasmática celular não foram significativamente afetadas dentro das primeiras 12 horas de exposição ao MeHg (300 nM, 600 nM e 1000 nM). Assim, essas condições foram escolhidas para investigar os mecanismos moleculares que medeiam a toxicidade induzida por MeHg nestas células, bem como os potenciais efeitos protetores dos compostos orgânicos de selênio tanto na concentração de 0,5 μ M quanto na concentração de 2 μ M.

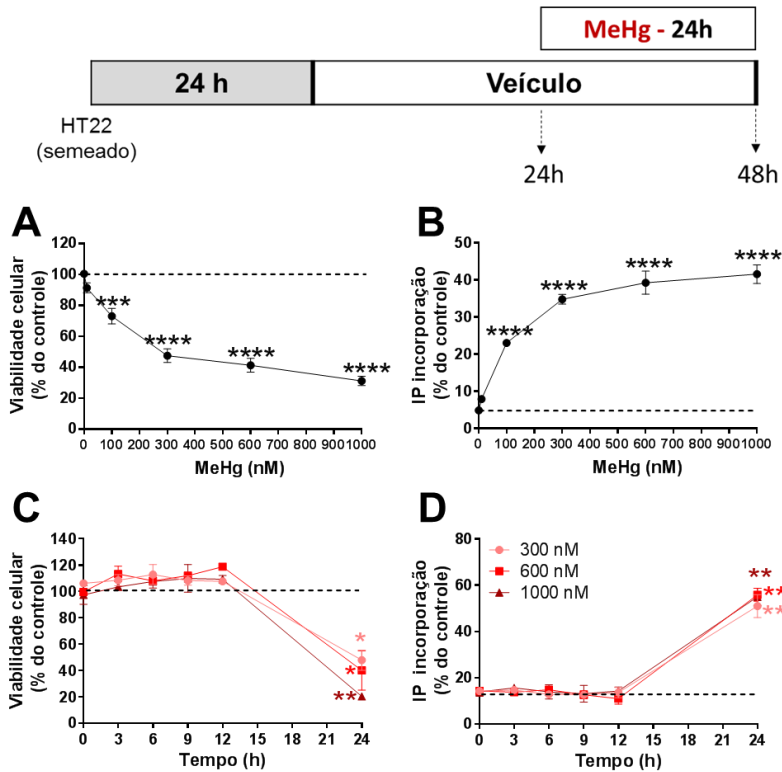


Figura 3.8. Caracterização da toxicidade de MeHg em células HT22. Células HT22 foram expostas a diferentes concentrações de MeHg (10 nM – 1000 nM) por 24 h (A, B) ou a 300 nM – 1000 nM de 0 a 24 h (C, D). A viabilidade celular foi avaliada pela redução de MTT (A, C) e dano na membrana celular pela captação de IP (B, D). Os resultados do teste MTT foram expressos como porcentagem da redução do MTT em relação ao controle (linha pontilhada). Os resultados do teste de IP foram expressos como porcentagem de células tratadas com Triton 0,2% (controle positivo; 100% de morte). Os dados foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados estão representados como média \pm SEM (A, B; n = 5) (C, D; n = 2). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 e **** p < 0,0001 indicam a diferença estatística em comparação ao controle (linha pontilhada), por ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Tukey.

Nossos resultados mostraram um efeito protetor diferenciado para RC513 (0,5 μM) contra o MeHg, o qual foi significativamente evidenciado sobre a redução da viabilidade celular (Fig. 3.9 A) e no dano na membrana plasmática mediadas por este toxicante (Fig. 3.9B). No entanto, o $(\text{PhSe})_2$ não protegeu as células nas mesmas condições experimentais. Por outro lado, quando as células foram pré-tratadas com a concentração de 2 μM , ambos os compostos induziram um efeito protetor frente ao MeHg, tanto na redução da viabilidade celular como no dano na membrana plasmática, inclusive em concentrações altas de 1000 nM de MeHg (Fig. 3.9C-D).

3.2.9. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE GPX MEDIADA POR MeHg EM CÉLULAS HT22

Os resultados obtidos a partir da Fig. 3.9 sugerem fortemente que as células tratadas com RC513 foram mais eficientes em neutralizar os efeitos do MeHg. Considerando que o sistema antioxidante dependente da glutatona (especialmente GPx) desempenha um papel fundamental no mecanismo de proteção destes compostos e que 12 h de exposição ao MeHg não induz morte nas células HT22 (Fig. 3.8C), foi avaliada a atividade da GPx após 12 h de exposição ao MeHg (600 nM). Nossos resultados mostraram novamente que o pré-tratamento com 0,5 μM de $(\text{PhSe})_2$ não tem um efeito modulador positivo sobre a atividade GPx em comparação ao aumento observado para RC513 (0,5 μM). Além disso, MeHg (600 nM) inibiu a atividade da GPx (aproximadamente 50%) no grupo controle e nas células pré-tratadas com 0,5 μM de RC513 (Fig. 3.10A). No pré-tratamento com 2 μM dos compostos, a atividade GPx das células foi inibida cerca de 15% para $(\text{PhSe})_2$ e cerca de 31% para RC513 (Fig. 3.10B).

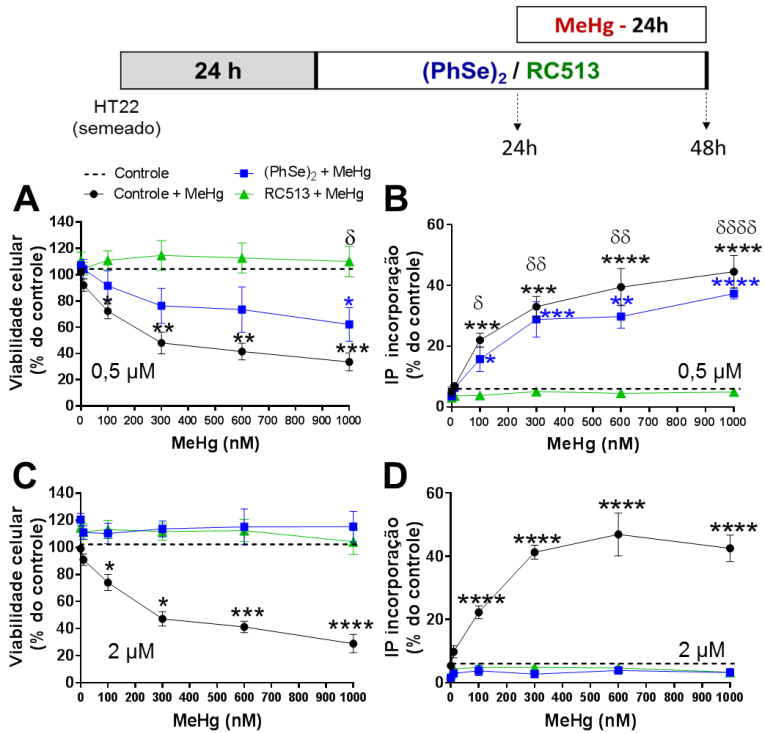


Figura 3.9. Efeito protetor diferencial do (PhSe)₂ e RC513 em células HT22 expostas ao MeHg. As células foram pré-tratadas com (PhSe)₂, RC513 (0,5 μM ou 2 μM) ou veículo por 24 h, seguida da co-exposição com MeHg (10 nM – 1000 nM) durante 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT (A e C) e pela dano da membrana plasmática através da incorporação de IP (B e D). Os resultados do teste MTT foram expressos como porcentagem da redução do MTT em relação ao controle (linha pontilhada). Os resultados do teste de IP foram expressos como porcentagem de células tratadas com Triton 0,2% (controle positivo; 100% de morte). Os dados foram representados como média ± erro padrão da média (EPM) (n = 5). **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001 e *****p* < 0,0001 indicam a diferença estatística em comparação ao controle (linha pontilhada), δ *p* < 0,05; δδ *p* < 0,01 e δδδδ *p* < 0,0001 indicam a diferença estatística entre (PhSe)₂ e RC513, por ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Tukey.

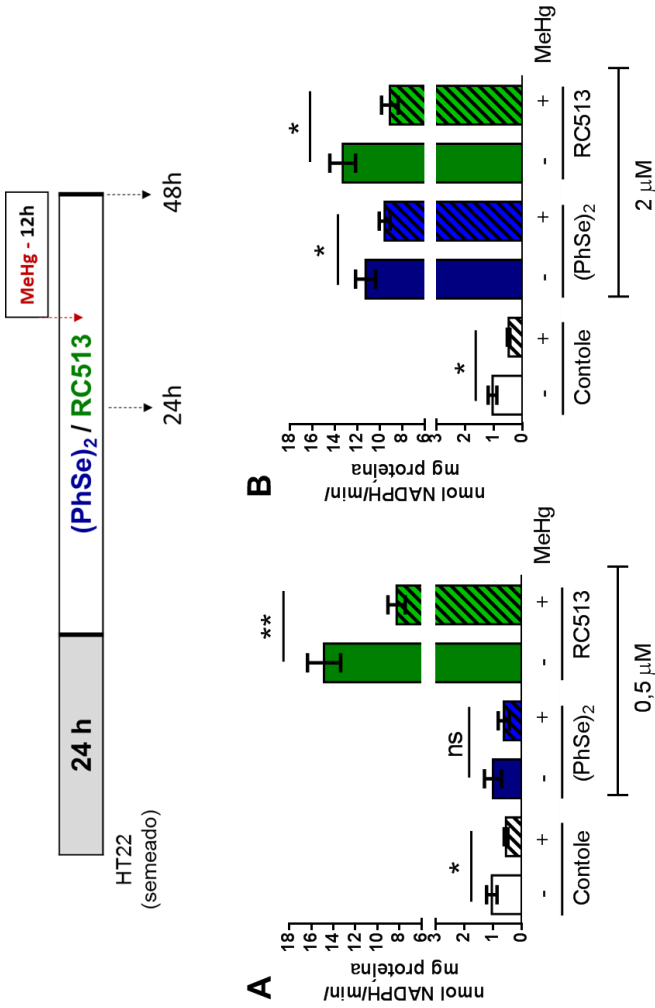


Figura 3.10. Inibição da atividade GPx por MeHg em células HT22. Células HT22 foram pré-tratadas com 0,5 (A) ou 2 μM (B) de (PhSe)₂, RC513 ou veículo durante 48 h em seguida foram expostas ao MeHg. A atividade GPx celular foi expressa como nanomoles de NADPH consumidos por minuto por miligrama de proteína. Os dados foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM) (n = 4). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ indicam a diferença estatística em comparação ao controle exposto a MeHg (600 nM) (barras tracejadas) por teste de student.

9. DISCUSSÃO GERAL

As células neuronais são particularmente vulneráveis ao estresse oxidativo devido a sua alta taxa metabólica e capacidade relativamente baixa de defesas antioxidantes (FERNANDEZ-FERNANDEZ; ALMEIDA; BOLAÑOS, 2012). Nessas células, a peroxidação lipídica, que é induzida pelo aumento dos níveis de peróxidos, pode perturbar significativamente a função celular e, portanto, levar à morte (COYLE; PUTTFARCKEN, 1993). Particularmente no cérebro, as enzimas da família glutatona peroxidase (GPx), em associação com outras peroxidases, orquestram uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo através da redução direta de peróxidos, favorecendo assim a sobrevivência neuronal (CRACK et al., 2001; BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013). Nesse cenário, um esforço significativo vem sendo feito para desenvolver moléculas que mimetizam a atividade peroxidase da família GPx, como os compostos orgânicos de selênio sintéticos (NOGUEIRA; ROCHA, 2011; ROCHA; PICCOLI; OLIVEIRA, 2017). Vários estudos têm descrito os efeitos benéficos destes compostos em modelos experimentais associados com o estresse oxidativo (inflamação, diabetes, aterosclerose, neurotoxicidade e hepatotoxicidade) (NOGUEIRA; ROCHA, 2010). Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi investigar o potencial efeito protetor de dois compostos orgânicos de selênio, (PhSe)₂ e RC513, em uma linhagem de células neuronais (células HT22) expostas ao tBuOOH (modelo *in vitro* de estresse oxidativo), bem como estabelecer os mecanismos subjacentes a esse efeito. Salienta-se que o composto RC513 é uma molécula inédita, derivada do composto probucol e recentemente sintetizada no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Nossos resultados apontam que ambos os compostos, (PhSe)₂ e RC513, podem ser propostos para uma potencial abordagem terapêutica para prevenir o dano neuronal relacionado ao estresse oxidativo. Em um modelo de toxicidade induzida por tBuOOH, ambos os compostos orgânicos de selênio protegeram significativamente as células neuronais HT22 contra o estresse oxidativo, a disfunção mitocondrial e a diminuição da viabilidade celular, os quais representam eventos comuns envolvidos na patogênese das doenças neurodegenerativas (LIN; BEAL, 2006). O efeito protetor destes compostos foi relacionado à indução de uma resposta antioxidante celular adaptativa, destacando-se o sistema antioxidante dependente de glutatona.

Uma maneira de induzir estresse oxidativo em culturas celulares *in vitro* é utilizar agentes pró-oxidantes como o tBuOOH, tendo em vista

sua capacidade de gerar estresse oxidativo celular durante seu processo de metabolização. Uma via de metabolização do tBuOOH, promovida pelo citocromo P450, gera radicais peroxil (ROO·) e alcoxil (RO·) (DAVIES, 1989), os quais iniciam a peroxidação lipídica com subsequentes alterações na permeabilidade e fluidez das membranas. Outra via utiliza a enzima GPx, a qual detoxifica o tBuOOH a *tert*-butanol às custas do consumo de GSH, levando este tripeptídeo à sua forma oxidada (GSSG) (CRANE et al., 1983), que por consequência pode alterar as homeostases tiólica e celular.

O hipocampo é uma estrutura comumente afetada nas doenças neurodegenerativas, principalmente em condições associadas com a perda de memória e a demência (MOODLEY; CHAN, 2014). Neste sentido, uma linhagem de células imortalizadas de neurônios hipocampais murinos (HT22) foi elegida como modelo *in vitro*, afim de estudar os mecanismos moleculares envolvidos no efeito protetor de compostos orgânicos de selênio frente ao estresse oxidativo induzido por tBuOOH. Cabe ressaltar que outros autores (MOOSMANN et al., 2001; JOSEY et al., 2013) também têm utilizado o tBuOOH como modelo de estresse oxidativo em células HT22 (KANG; BAEK; KIM, 2005).

Uma redução da viabilidade celular, dependente da concentração e do tempo de exposição ao tBuOOH, foi observada em células HT22. No entanto, o pré-tratamento com os compostos (PhSe)₂ e RC513 (2 µM) por 48 h manteve a viabilidade celular da linhagem neuronal HT22 expostas ao tBuOOH similar àquela do grupo controle. Os efeitos pró-oxidantes de tBuOOH foram amplamente relatados na literatura, especialmente em modelos experimentais *in vitro* usando culturas de células (Tabela 2). Nesse sentido, a geração de espécies oxidantes e a disfunção mitocondrial induzida por tBuOOH pode culminar em comprometimento energético (TURRENS, 2003; BOLAÑOS et al., 2009) e favorecer a morte celular (HAIDARA et al., 2002; PIRET et al., 2004; LV et al., 2017). Nosso estudo mostrou que o tBuOOH causou um rápido aumento da geração de espécies oxidantes (monitorada por DCF) desde os primeiros minutos de exposição (Fig. 1.3 e 2.3), entre eles o ânion superóxido, os quais contribuíram na indução da disfunção mitocondrial e redução na viabilidade celular observada na linhagem neuronal HT22. Em concordância com nossos resultados, estudos *in vitro* prévios também descreveram os efeitos pró-oxidante do tBuOOH em células neuronais, favorecendo a inibição do transporte axonal através da peroxidação, com alterações degenerativas subsequentes em organelas como na membrana mitocondrial, culminando em morte celular (SONEE et al., 2003; ISONAKA; HIRUMA; KAWAKAMI, 2011; HAJIEVA et al., 2015).

O tratamento com concentrações não tóxicas de (1-5 μM) $(\text{PhSe})_2$ ou de (1-5 μM) RC513 tornou as células mais eficientes na detoxificação de tBuOOH (ou espécies oxidantes derivadas), o que, por sua vez, impediu a redução na viabilidade celular (Fig. 1.2 e 2.2), mostrando que essas células podem suportar melhor as situações pró-oxidantes a que estão expostas. Esta observação *in vitro* pode explicar o efeito neuroprotetor de $(\text{PhSe})_2$, anteriormente descrito em modelos *in vivo* de doenças neurodegenerativas, como na doença de Alzheimer (ZAMBERLAN et al., 2014) e neurotoxicidade (CdCl_2 , H_2O_2 , metimazol e isquemia/reperfusão) (LUCHESE et al., 2007; POSSER et al., 2008; DIAS et al., 2014; DOBRACHINSKI et al., 2014). Além disso, corroborando com nossos resultados, Dias et al. (2014) descreveram que o pré-tratamento com $(\text{PhSe})_2$ diminui a geração de espécies oxidantes no hipocampo de animais expostos a metimazol (modelo de hipotireoidismo). Em outro estudo, o $(\text{PhSe})_2$ inibiu a geração de espécies oxidantes em homogenatos de fígado e em mitocôndrias expostos ao acetaminofeno, um indutor de danos oxidativos e depleção da GSH hepática (CARVALHO et al., 2013). Estes dados, em conjunto, sugerem que o $(\text{PhSe})_2$ favorece a detoxificação de espécies oxidantes em diferentes tipos celulares, incluindo células neuronais. Em relação ao composto orgânico de selênio RC513 (um derivado de probucol), salienta-se que estudos anteriores de nosso grupo mostraram que o probucol, em concentrações bem maiores (10 - 30 μM) do que aquelas aqui testadas para o análogo RC513 (2 μM), melhorou a resposta antioxidante em cultura primária de neurônios de cerebelo e em fatias de estriado (FARINA et al., 2009; COLLE et al., 2013b). Esta comparação sugere que a modificação na molécula do probucol pode ter contribuído para o aumento da eficiência do efeito protetor do RC513, inclusive em concentrações de 0,5 μM mostrados no capítulo 3.

As mitocôndrias são a principal fonte de espécies oxidantes e, por outro lado, representam um alvo do estresse oxidativo e suas consequências deletérias (LIN; BEAL, 2006; MURPHY, 2009). As mitocôndrias são reguladores-chaves da morte celular (GRANVILLE; GOTTLIEB, 2002; TAIT; GREEN, 2013), sendo que diversas linhas de evidência sugerem que a disfunção mitocondrial ocorre precocemente e tem participação efetiva na patogênese das doenças neurodegenerativas (LIN; BEAL, 2006). Portanto, a proteção da integridade e função mitocondrial está emergindo como uma estratégia promissora para prevenir danos neuronais. Considerando o perfil metabólico oxidativo dos neurônios, a fosforilação oxidativa aeróbica (OXPHOS) é crucial para a obtenção adequada de energia metabólica nessas células. Assim, os

neurônios morrem rapidamente após a inibição da respiração mitocondrial em comparação com os astrócitos, que são mais competentes no uso de via glicolítica para obter ATP (BOLAÑOS; ALMEIDA; MONCADA, 2010). Por outro lado, evidências indicam que as células HT22 expostas a condições de estresse oxidativo crônico frente ao glutamato apresentaram efeitos profundos na fisiologia mitocondrial. Na qual houve um deslocamento do metabolismo energético da fosforilação oxidativa para a via da *hexose monophosphate shunt* (HMS), indicando que a adaptação metabólica tem uma função chave na sobrevivência destas células em condições de estresse (PFEIFFER et al., 2014). Nossos resultados mostraram que a intensa geração de espécies oxidantes induzida por tBuOOH causou um impacto rápido e significativo na função mitocondrial das células HT22 previas a morte.

A disfunção mitocondrial foi observada já muito precocemente (2 h após) à exposição a 40 μM de tBuOOH. O processo de comprometimento da função respiratória foi aqui caracterizado pela diminuição da capacidade respiratória máxima (OCR máximo) e da capacidade de reserva mitocondrial nas células HT22 (Fig. 1.4 e 2.4). Cabe mencionar que não foi observado nenhum efeito significativo da exposição a 40 μM de tBuOOH, por 2 h, em relação à diminuição na viabilidade celular, o que indica que a perda de homeostase mitocondrial induzida por tBuOOH precedeu à diminuição da viabilidade celular induzida por este pró-oxidante (que ocorre em 12 h - Fig. 1.1C e 2.1C-D). Uma exposição ligeiramente mais longa ao tBuOOH (4 h) prejudicou ainda mais a função mitocondrial, reduzindo a OCR basal, OCR ligado à síntese de ATP, OCR máximo e a capacidade de reserva mitocondrial (Fig. 1.4C e 2.4C). É sabido que a quantidade excessiva de espécies oxidantes produzida por tBuOOH induz a oxidação de proteínas mitocondriais, resultando em disfunção mitocondrial, comprometimento bioenergético e geração exponencial de espécies oxidantes. De fato, a diminuição da capacidade de reserva mitocondrial foi descrita como um forte indicador de disfunção mitocondrial (BRAND; NICHOLLS, 2011). Além disso, Perron et al. (2013) descreveu o estresse celular resultante de uma perda precoce de capacidade de reserva mitocondrial em células fotorreceptoras 661W, sem afetar a respiração basal aos 30 min após de exposição a tBuOOH (50 μM), com morte celular subsequente às 24 h. A este respeito, algumas evidências indicam que compostos que melhoram as funções mitocondriais (ou químicos que previnem a disfunção mitocondrial) representam uma estratégia farmacológica promissora para contrapor os efeitos deletérios das espécies oxidantes (LYAKHOVICH; GRAIFER, 2015).

No presente estudo, os resultados indicam que o tratamento com $(\text{PhSe})_2$ ou RC513 foi eficiente na prevenção da disfunção mitocondrial induzida por tBuOOH provavelmente pela neutralização deste peróxido ou espécies oxidantes derivadas, protegendo contra a diminuição da viabilidade celular e a morte celular induzida por tBuOOH. De acordo com esses dados, estudos anteriores de nosso grupo demonstraram que o $(\text{PhSe})_2$ melhorou a capacidade de reserva mitocondrial e, portanto, impediu a disfunção mitocondrial induzida por oxidantes biológicos em células endoteliais (HORT et al., 2014; FIUZA et al., 2015). Embora, nossos resultados mostrem que $(\text{PhSe})_2$ e RC513 protegem às células HT22 da disfunção mitocondrial induzida por tBuOOH, não observamos um aumento da capacidade de reserva mitocondrial (Fig. 1.4). Esses diferentes efeitos na capacidade de reserva mitocondrial das células endoteliais e neuronais tratadas com $(\text{PhSe})_2$ podem estar relacionados às necessidades bioenergéticas da cada tipo celular. Por outro lado, embora não existam estudos anteriores relacionados ao RC513 e disfunção mitocondrial, o succinobucol, um composto também derivado do probucol, mitigou os eventos secundários resultantes da inibição no complexo II mitocondrial (morte celular, geração de espécies oxidantes, e despolarização do $\Delta\Psi_m$) em células de neuroblastoma SH-SY5Y expostas ao ácido 3-nitroprotionico (3-NP) (COLLE et al., 2016). Juntos, esses achados reforçam a ideia de que o $(\text{PhSe})_2$ e RC513 podem manter a função mitocondrial em condições de estresse oxidativo, preservando assim a integridade bioenergética e funcional das mitocôndrias em células neuronais expostas a condições oxidantes. Além disso, o pré-tratamento com $(\text{PhSe})_2$ e RC513 impediu a geração mitocondrial do ânion superóxido induzida por diferentes concentrações de tBuOOH (40, 70 e 100 μM) (Fig. 1.3F e 2.3E-G), reforçando a ideia de que a proteção induzida por ambos os compostos envolveu a manutenção adequada da função mitocondrial em células HT22. Baseado nesses resultados, é possível sugerir que os efeitos mitoprotetores mediados por $(\text{PhSe})_2$ e RC513 foram responsáveis pela sobrevivência das HT22 expostas a tBuOOH.

Estudos recentes postulam que as propriedades antioxidantes de $(\text{PhSe})_2$ vão muito além da sua ação mimética da GPx (de BEM et al., 2013; HORT et al., 2014). De fato, a ação protetora de $(\text{PhSe})_2$ foi observada a uma baixa concentração (2 μM) e dependente do tempo, descartando um exclusivo efeito antioxidante ligado à sua atividade tiol peroxidase. Além disso, é importante considerar que a atividade de tiol peroxidase de $(\text{PhSe})_2$ é imensamente menor do que a GPx nativa (BARTOLINI et al., 2015), fato que parece não ser suficiente para

explicar suas estabelecidas propriedades antioxidantes em sistemas biológicos (BARBOSA et al., 2017). Além disso, em comparação ao efeito antioxidante já demonstrado para $(\text{PhSe})_2$, o efeito antioxidante direto (*scavenger*) do RC513 é significativamente menor do que o antioxidante clássico, trolox (QUISPE et al., 2018). Tendo em conta que os efeitos protetores observados (i) ocorreram em um protocolo experimental baseado no pré-tratamento com ambos compostos; (ii) que a proteção não poderia ser atribuída exclusivamente à atividade tiol peroxidase do $(\text{PhSe})_2$ e (iii) a baixa capacidade de *scavenger* do RC513, nós hipotetizamos que o efeito citoprotetor aqui observado provavelmente envolve a ativação de respostas celulares relacionadas à modulação da defesas antioxidantes ao invés de uma reação direta (atividade *scavenger*) entre os compostos e o tBuOOH (ou espécies oxidantes derivadas). De acordo com esta hipótese, resultados anteriores de nosso grupo mostraram que os efeitos benéficos do probucol (a molécula base para a síntese do RC513) e de seu derivado (succinobucol) foram relacionados ao aumento do sistema antioxidante endógeno (SANTOS et al., 2015; COLLE et al., 2016). Da mesma forma, já foi também descrito pelo nosso grupo que a ação protetora do $(\text{PhSe})_2$ contra ação de oxidantes biológicos em células endoteliais foi através da modulação da capacidade antioxidante celular (de BEM et al., 2013).

Como mencionado anteriormente, a inibição da superprodução de espécies oxidantes e/ou “aumento da detoxificação” (Fig. 1.3 e 2.3) e a manutenção da bioenergética mitocondrial (Fig. 1.4 e 2.4) mediada pelos compostos orgânicos de selênio em células HT22 expostas ao tBuOOH sugere que a citoproteção observada está relacionada com o aumento de capacidade de detoxificar espécies oxidantes. Tendo em conta que os peróxidos são classicamente detoxificados pelas peroxidases e que as glutionas peroxidases representam uma grande família de proteínas envolvidas na detoxificação de diferentes peróxidos (URSINI et al., 1995; BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013), investigamos se ambos compostos orgânicos de selênio seriam capazes de modular esse sistema antioxidante, com foco especial nas duas principais isoenzimas da família glutationa peroxidase (GPx1 e GPx4). Nossos resultados mostraram que o $(\text{PhSe})_2$ modulou o sistema antioxidante da glutationa em células HT22 por aumentar a expressão gênica da GPx1 e a atividade GPx, bem como o nível de seu substrato, GSH, através do aumento na expressão de *Gclc* que codifica a subunidade catalítica da GCL, a enzima limitante na via de síntese deste tripeptídeo (Fig. 3.3). No entanto, o RC513 promoveu unicamente aumento significativo na expressão de *Gpx1* e na atividade GPx. Para ambos compostos, o aumento dos níveis de expressão de *Gpx1*

correlacionou com o aumento da atividade GPx em células HT22 (Fig. 3.1), o que sugere claramente que os compostos induziram o aumento da síntese proteica desta enzima. Recentemente, um estudo realizado pelo nosso grupo demonstrou que o $(\text{PhSe})_2$ aumentou a atividade e expressão proteica da enzima GPx em células endoteliais e em macrófagos (de BEM et al., 2013; STRALIOTTO, 2016). Esta rápida e eficiente modulação antioxidante mediada por ambos compostos torna estas células mais resistentes ao dano oxidativo. O aumento dos níveis de transcritos da *Gclc* promovido pelo $(\text{PhSe})_2$ correlacionou-se com o aumento dos níveis de GSH. Sabe-se que a GSH é parte do sistema de glutathiona peroxidase e também um doador de elétrons que reage com radicais livres (DRINGEN, 2000) e sua diminuição tem sido associada com a indução de morte neuronal e comprometimento cognitivo (MANDAL et al., 2015). Portanto, a habilidade de um composto em aumentar ou reciclar o conteúdo celular de GSH é extremamente relevante na proposição de futuras terapias eficientes para o tratamento de doenças neurodegenerativas. Juntas, essas evidências reforçam a ideia de que simples compostos orgânicos de selênio atuem como antioxidante indireto e efetivo pela modulação de respostas antioxidantes intracelulares. No entanto, cabe mencionar que existe uma resposta de proteção diferencial entre $(\text{PhSe})_2$ e RC513.

Em relação à expressão de *Gpx4*, é razoável supor que a diminuição da expressão de *mGpx4* (1,3 vezes) vista neste estudo não representa um evento biologicamente relevante apesar da significância estatística ($p < 0,05$). Essa ideia baseia-se nos limiares funcionais (valor de *cutoff*) utilizados nas análises de PCR quantitativas (EDMUNDS et al., 2014), que estabelece uma alteração mínima na expressão do gene alvo ($\geq 1,5$ vezes) necessária para ser considerada como uma resposta biologicamente significativa ao tratamento (em adição à significância estatística). Esses resultados indicam que a isoforma *Gpx1* é preferencialmente sintetizada nas células tratadas com $(\text{PhSe})_2$ e RC513, e também sugerem que os compostos regulam especificamente a maquinaria transcricional da *Gpx1* do que a *Gpx4* nesta linhagem neuronal HT22.

Cabe ressaltar que existe uma reduzida síntese da GSH no cérebro em comparação ao fígado e rins (DRINGEN, 2000), e que uma diminuição nos níveis deste tripeptídeo em partes importantes do cérebro, como o hipocampo, está sendo associada a doenças neurodegenerativas (MANDAL et al., 2015). Neste contexto, como mencionado anteriormente, o $(\text{PhSe})_2$ induziu um aumento dos níveis de GSH e NPSH nas células HT22, mas o RC513 não afetou estes parâmetros (Fig. 3.3A-

B). Nossos resultados concordam com Straliozzo (2016), que também demonstrou um aumento da síntese de GSH em macrófagos tratados com $(\text{PhSe})_2$. Embora não avaliamos os níveis de GSH na presença do tBuOOH, nossos resultados sugerem que o pré-tratamento com os compostos $(\text{PhSe})_2$ e RC513 ajudariam a manter a homeostase redox nas células HT22. Além disso, o derivado do probucol, o succinobucol, induziu um aumento nos níveis de GSH, na atividade da enzima GCL, bem como nos transcritos do gene da GCL, em células de neuroblastoma SH-SY5Y depois de 6 dias de pré-tratamento com este composto (COLLE et al., 2016). Porém, o novo derivado do probucol, RC513, provavelmente apresenta um mecanismo diferente daqueles descritos para o probucol ou seus derivados (STOCKER, 2009).

Nossos resultados indicam que o $(\text{PhSe})_2$ e RC513 induziram um incremento na capacidade antioxidante das células HT22 tornando estas mais resistentes ao estresse oxidativo gerado pelo tBuOOH. Para avaliar a contribuição da GPx na proteção induzida pelos compostos orgânicos de selênio, foi realizado um protocolo experimental usando ácido mercaptosuccínico (MS), um inibidor da GPx (CHAUDIERE; WILHELMSSEN; TAPPEL, 1984; DUNNING et al., 2013). Os resultados mostraram que a atividade GPx foi significativamente inibida (50-80%) após o tratamento com MS (Fig. 1.6A e 2.6A) nas células pré-tratadas com $(\text{PhSe})_2$ ou do RC513, todavia o MS *per se* não causou diminuição na viabilidade das células HT22 (Fig. 1.6B e 2.6B-C). No entanto, nossos resultados mostraram que o MS diminuiu o efeito protetor do $(\text{PhSe})_2$ e do RC513 em células HT22 expostas a diferentes concentrações de tBuOOH. Estes dados indicam que o aumento na atividade de GPx promovido pelos compostos orgânicos de selênio foi um componente chave para a citoproteção induzida por $(\text{PhSe})_2$ e RC513. Deve-se mencionar a importância da atividade GPx, uma vez que sua diminuição promove a suscetibilidade ao estresse oxidativo, propiciando o acúmulo de oxidantes nocivos (LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2011; BOONE et al., 2017), e ainda porque outras selenoproteínas não podem substituir sua função na proteção do estresse oxidativo generalizado (BRIGELIUS-FLOHE; MAIORINO, 2013).

Além da observada modulação na atividade de GPx após o tratamento com os compostos orgânicos de selênio, é importante mencionar que os efeitos farmacológicos de alguns compostos orgânicos de selênio podem ser explicados pela sua capacidade de oxidar os grupos tiol de proteínas e de fatores de transcrição desencadeando respostas celulares regulatórias, como por exemplo a ativação de Nrf2 (de BEM et al., 2013; BARBOSA et al., 2017), que estimula a expressão de genes

envolvidos na resposta antioxidante. Além disso, alguns compostos orgânicos de selênio também exibem efeitos protetores por meio da indução de peroxirredoxinas (FIUZA et al., 2015). Portanto, não desconsideramos a contribuição de outros mecanismos sobre a regulação da resposta antioxidante e consequente citoproteção promovida por $(\text{PhSe})_2$ e RC513. Neste sentido, também avaliamos neste modelo experimental o sistema de tiorredoxina/peroxirredoxina (WANG et al., 2016) através da expressão do gene de peroxirredoxinas (*Prdx2*, *Prdx3* e *Prdx5*) e do gene *Trxnd2*, que codifica a tiorredoxina redutase 2, uma proteína mitocondrial dependente do selênio. No entanto, não foram encontradas diferenças em sua expressão em diferentes tempos (3 h, 6 h, 12 h e 24 h) após o tratamento das células HT22 com $(\text{PhSe})_2$ e RC513, com exceção do incremento da expressão de *Prdx5* em 3 h-6 h e *Prdx2* em 6 h de pré-tratamento com RC513. Esses resultados sugerem que as peroxirredoxinas podem ser importantes também no mecanismo de proteção do RC513, diferentemente do $(\text{PhSe})_2$. Por outro lado, contrariamente aos nossos resultados, o $(\text{PhSe})_2$ não aumentou a atividade de GPx e a expressão proteica desta enzima em células de neuroblastoma (MEINERZ et al., 2017), indicando uma resposta celular variada.

Mesmo que nossos resultados indicam que o aumento da atividade de GPx é um evento principal relacionado à proteção induzida por $(\text{PhSe})_2$ e RC513, os mecanismos moleculares que medeiam este aumento ainda são pouco entendidos. A este respeito, a utilização de selênio inorgânico (após o possível metabolismo de $(\text{PhSe})_2$ e RC513) para a síntese de selenoproteínas (por exemplo GPx) não pode ser descartada. A cisão metabólica da ligação do selênio e carbono em disselenetos orgânicos foi descrita em estudos *in vivo* (ADAMS; KOCSIS; SNYDER, 1989) e compostos orgânicos de selênio simples (incluindo disselenidos) podem fornecer selênio ao *pool* de selênio inorgânico (SCHWARZ; FOLTZ, 1958). Nesse cenário, parece que o selênio inorgânico liberado a partir de selenetos aromáticos e alifáticos pode ser usado para a síntese de selenoproteínas (para uma revisão, ver Rocha et al. (2017)). Assim, o efeito estimulante de $(\text{PhSe})_2$ e RC513 em relação à atividade GPx pode estar relacionado, pelo menos em parte, com o aumento da disponibilidade de selênio inorgânico (após o metabolismo destes compostos), o qual pode ser usado para a síntese desta selenoproteína. Nesse cenário, pode-se esperar que a isoenzima GPx1 seja preferencialmente sintetizada quando comparada à GPx4 porque foi a primeira que apresentou uma maior quantidade de transcritos em células HT22 após o tratamento com $(\text{PhSe})_2$ e RC513.

Embora ambas enzimas (GPx1 e GPx4) possam detoxificar tBuOOH, vários autores relataram que o tBuOOH é um excelente substrato para a enzima GPx1 em comparação com GPx4 (URSINI et al., 1995; GROSSMANN; WENDEL, 1983; MAIORINO; GREGOLIN; URSINI, 1990; KRISKA et al., 2008), o que pode explicar a necessidade de concentrações consideravelmente maiores de tBuOOH para induzir a morte nas células expressando altos níveis de GPx1 (KRISKA et al., 2008). Esses dados ajudam a explicar nossos resultados em relação à proteção de células HT22 tratadas com (PhSe)₂ e RC513 em altas concentrações de tBuOOH (Fig. 3.2A), o que pode ser devido em grande parte ao incremento da GPx1.

Como mencionado acima, possivelmente fatores de transcrição podem ser envolvidos na expressão gênica de GPx1 nestas células. O fator de transcrição *forkhead box O* (FOXO) poderia estar envolvido na ativação da expressão de *Gpx1* e de outras enzimas antioxidantes (VAN DER VOS; COFFER, 2011; KLOTZ et al., 2015). Além disso, estudos realizados por Furuyama et al. (2000) encontraram sítios conservados (TTGTTTAC) de ligação a FoxO nas sequências promotoras da glutathione peroxidase humana e de rato, sugerindo que Foxo3 também pode regular diretamente a transcrição da GPx. Por exemplo, células eritróides deficientes para o gene FoxO3 (*foxo3^{-/-}*) mostraram uma diminuição dos genes da Catalase, SOD1, SOD2 e GPx1 (MARINKOVIC et al., 2007; KLOTZ et al., 2015). Portanto, neste estudo, avaliou-se a expressão de genes (*Sod2*, *Cat*, *Prdx2*, *Prdx3* e *Prdx5*) regulados por FoxO (GREER; BRUNET, 2005; MIYAMOTO et al., 2009; VAN DER VOS; COFFER, 2011). Observou-se um incremento na expressão do gene *Cat* a partir de 6 h no tratamento com (PhSe)₂; no entanto, o tratamento com RC513 aumentou a expressão de *Prdx5* em 3 e 6 h e *Prdx2* somente em 6 h após o pré-tratamento. Esses resultados indiretamente indicam que ambos compostos podem ativar a expressão de genes específicos através do fator de transcrição FoxO.

Por outro lado, o fator de transcrição Nrf2 também tem sido relacionado à regulação da expressão de *Gpx1*. Estudos realizados em células de gliomas mostraram que miR-153 (microRNA-153) inibe o fator de transcrição Nrf2, com subsequentemente diminuição da expressão do gene *Gpx1* (YANG et al., 2015). Neste sentido, avaliamos genes (*HO-1* e *Gclc*) alvos de Nrf2 e observamos aumento na expressão de *HO-1* em 3 h e *Gclc* a partir de 3 h em células pré-tratadas com (PhSe)₂, indicando indiretamente que o (PhSe)₂ pode ativar Nrf2 nestas células. Trabalhos prévios de nosso grupo já demonstraram que o (PhSe)₂ promoveu a translocação nuclear de Nrf2 em células endoteliais (de BEM

et al., 2013) e foi capaz de aumentar a expressão da peroxirredoxina 3, um alvo específico de FoxO (FIUZA et al., 2015). Da mesma forma, já foi descrito que o derivado de probucol, succinobucol, propiciou um aumento da atividade antioxidante através da ativação de Nrf2 (COLLE et al., 2016). Entretanto, em células pré-tratadas com o derivado do probucol, RC513, os genes clássicos (*HO-1* e *Gclc*) ativados por Nrf2 não foram modulados por este composto. Isto nos sugere mecanismos de proteção distintos para ambos os compostos orgânicos de selênio. Cabe ressaltar que as expressões de *Cat* e *Prdx2* também podem ser reguladas por Nrf2 (DONG; SULIK; CHEN, 2008; SATOH et al., 2011); portanto, nossos resultados do aumento da expressão destes genes (*Cat* para $(\text{PhSe})_2$ e *Prdx2* para RC513) podem ser devido também ao fator de transcrição Nrf2 nestas células. Neste contexto, o conjunto de resultados obtidos sugere que estes compostos orgânicos de selênio avaliados parecem ter a capacidade de ativar um ou ambos fatores de transcrição (Nrf2 e FoxO), os quais estariam associados à transcrição de *Gpx1* nestas células HT22.

Como já foi mencionado, nossos resultados indicam que ambos os compostos, $(\text{PhSe})_2$ e RC513, a uma concentração de 2 μM , induziram um incremento na capacidade antioxidante das células HT22. No entanto, também algumas diferenças no mecanismo de proteção de ambos compostos foram observados (Capítulo I e Capítulo II). Neste contexto, no Capítulo III, aprofundamos os estudos para conhecer melhor o mecanismo de proteção e realizar uma comparação entre os efeitos de ambos compostos. Como já mencionado, diferenças na expressão de genes antioxidantes específicos foram observadas em células pré-tratadas com os compostos, que possivelmente indicam a ativação dos fatores de transcrição Nrf2 e/ou FoxO nestas células. No entanto, mais estudos são necessários para fornecer detalhes da participação desses fatores de transcrição e outros mecanismos na proteção de $(\text{PhSe})_2$ e RC513 em células HT22. Ambos compostos aumentaram a expressão do gene *Gpx1* desde as 6 h de pré-tratamento (Fig. 3.1A), no entanto um aumento diferencial na atividade GPx foi observada em 6 h, 30 h (Fig. 3.1C) e 48 h (Fig. 3.6C) de pré-tratamento com RC513 (2 μM), indicando que o RC513 induz uma maior atividade apesar de possuir níveis similares de transcritos de *Gpx1* do que $(\text{PhSe})_2$. Além disso as células também foram expostas a altas concentrações de tBuOOH e a outros agentes estressores (SIN-1, Glutamato e MeHg) para indiretamente determinar diferenças no mecanismo de proteção entre ambos compostos e para avaliar o potencial protetor destes compostos frente a outros estressores causantes de neurotoxicidade. Primeiramente, os resultados indicaram que ambos

compostos, a uma concentração de 2 μM , protegem a redução da viabilidade celular contra altas concentrações de tBuOOH (400 μM), SIN-1 (2 mM), glutamato (10 mM) e MeHg (1000 nM). O aumento dos níveis de GSH e NPSH observados somente nas células tratadas com $(\text{PhSe})_2$ podem ainda ser relacionados ao aumento da expressão de *Gclc* desde as 3 h de pré-tratamento com este composto. No entanto, foi observado que 3 h de pré-tratamento com RC513 foram suficientes para manter a viabilidade celular após completar 48 h de incubação (Fig. 3.5), seguida da exposição ao tBuOOH, indicando o efeito no tempo de pré-tratamento e que o RC513 poderia atuar mais rapidamente (ou existir uma melhor captação deste pelas células) em comparação de $(\text{PhSe})_2$.

Além disso, um efeito protetor diferencial na viabilidade celular e atividade GPx foi observada nas células HT22 pré-tratadas com 0,5 μM de RC513 em comparação a $(\text{PhSe})_2$ frente a tBuOOH (40 μM), glutamato (5 mM) e MeHg (600 nM), indicando um efeito protetor dependente da concentração dos compostos. Até agora, esses resultados indicam que 0,5 μM de RC513 seriam suficientes para proteger as células e ativar os mecanismos de defesa, com similares níveis de atividade GPx quando comparados a um pré-tratamento com 2 μM . Pelo contrário, essa baixa concentração (0,5 μM) de $(\text{PhSe})_2$ não protegeu as células, o que pode sugerir que é necessário um maior tempo de tratamento com esta baixa concentração ou uma maior concentração para que a proteção seja desencadeada. No entanto, cabe ressaltar que os tratamentos com 2 μM de $(\text{PhSe})_2$ e RC513 exerceram um efeito protetor nas células frente a glutamato (inclusive até 10 mM) e frente a SIN-1 e MeHg. Esses últimos resultados ampliam a gama de estressores em células HT22 aos quais estes compostos podem proteger. O mecanismo de ação destes compostos merecem ser estudados mais detalhadamente no futuro.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

- Este estudo mostra que os efeitos citoprotetores do $(\text{PhSe})_2$ em células HT22 vão além da sua já conhecida atividade tiol-peroxidase.
- O efeito protetor de ambos os compostos está relacionado ao aumento da atividade da GPx, uma proteína chave na detoxificação de peróxidos.
- A proteção proporcionada pelos compostos orgânicos de selênio, $(\text{PhSe})_2$ e RC513, mostrou diferenças em relação à modulação do conteúdo de GSH e expressão gênica, o que sugere a existência de algumas particularidades relativas à ação de cada composto.
- O aumento da atividade GPx induzido por ambos compostos está relacionado ao significativo incremento nos níveis de transcritos *Gpx1* nesta linhagem de células neuronais.
- RC513 e $(\text{PhSe})_2$, em uma concentração de 2 μM , protegem as células frente a altas concentrações de tBuOOH e frente a outros agentes estressores (SIN-1, Glutamato e MeHg), indicando o potencial destes compostos para futuros abordagens frente a condições neurodegenerativas.
- O RC513 aumentou a expressão de *Prdx5* e *Prdx2*, enquanto que o $(\text{PhSe})_2$ aumentou a expressão de *Cat*, *HO-1* e *Gclc* em células HT22, indicando a regulação diferencial de genes pelos compostos.
- O $(\text{PhSe})_2$ e o RC513 ativam genes específicos de defesas antioxidantes relacionados aos fatores de transcrição Nrf2 e FoxO, indicando uma possível participação destes fatores como parte do mecanismo de proteção.
- O RC513 protegeu as células HT22 mesmo em tempos curtos de pré-tratamento (exemplo 3h), indicando uma ação mais rápida ou uma melhor captação pelas células em comparação de $(\text{PhSe})_2$.
- O RC513 protegeu as células HT22 expostas a tBuOOH em uma concentração de 0,5 μM (o que não ocorreu com o composto $(\text{PhSe})_2$), indicando uma maior capacidade protetora em uma menor concentração.
- No presente estudo, foi desvendado parcialmente o mecanismo molecular de $(\text{PhSe})_2$ e RC513 em células HT22 envolvendo a modulação da GPx.
- Nossos resultados indicam que $(\text{PhSe})_2$ e o RC513 (novo derivado do probucol) representam promissoras moléculas

neuroprotetivas. No entanto, estudos adicionais são necessários com o intuito de estabelecer os mecanismos subjacentes ao efeito protetor bem como aspectos de segurança/toxicidade em condições *in vivo*.

Como conclusão geral podemos dizer que os compostos orgânicos de selênio (PhSe)₂ e RC513 protegem da morte celular induzida por tBuOOH por prevenir a geração de espécies oxidantes e a disfunção mitocondrial nas células neuronais HT22. Este efeito neuroprotetor foi atribuído ao incremento da defesa antioxidante celular, relacionada à modulação do sistema antioxidante da glutatona, evidenciado pelo incremento do RNAm da *Gpx1* e a atividade GPx, embora haja particularidades no mecanismo de ação de cada composto.

11. PERSPECTIVAS

- ✓ No presente estudo, foi demonstrado o envolvimento do sistema dependente de glutathiona no mecanismo de proteção de ambos compostos orgânicos de selênio. No entanto, estudos futuros deveriam ser desenvolvidos para investigar possíveis fatores de transcrição que podem ser ativados por estes compostos, tais como Nrf2 e FoxO. Além disso, técnicas como RNA de interferência poderiam ser empregadas para diminuir a expressão gênica destes fatores de transcrição, visando confirmar ou não seu papel no mecanismo de proteção de $(\text{PhSe})_2$ e RC513. Além disso, podem ser usadas técnicas como imunolocalização e western blot para avaliar a migração nuclear e o conteúdo destes fatores em células HT22 pré-tratadas com $(\text{PhSe})_2$ e RC513.
- ✓ O aumento de expressão gênica da GPx1 e atividade GPx foram observadas após o tratamento com ambos compostos. No entanto, estudos adicionais poderiam ser desenvolvidos para avaliar a expressão proteica desta enzima usando *western blot*.
- ✓ Os ensaios *in vitro* realizados demonstraram que estes compostos orgânicos de selênio poderiam ter potenciais efeitos neuroprotetores em modelos *in vivo* de doenças neurodegenerativas, principalmente o RC513, que não possui literatura científica prévia. Desta forma, seriam muito interessante avaliar vias de administração deste composto (ex: via intranasal ou fusão com nanopartículas) para facilitar seu transporte pela barreira hematoencefálica, direcionando-o ao sítio de ação de forma mais rápida e eficiente do que a via oral.
- ✓ No presente estudo se determinou o efeito protetor do $(\text{PhSe})_2$ e RC513 frente a outros estressores (SIN-1, glutamato, MeHg) através da viabilidade celular, mas estudos complementares são necessários e merecem ser realizados para ter um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nestes efeitos.

12. REFERÊNCIAS

- ADAMS, W. J. J.; KOCSIS, J. J.; SNYDER, R. Acute toxicity and urinary excretion of diphenyldiselenide. **Toxicology Letters**, v. 48, n. 3, p. 301–310, 1989.
- AMOROSO, S.; GIOIELLI, A.; CATALDI, M.; DI RENZO, G.; ANNUNZIATO, L. In the neuronal cell line SH-SY5Y, oxidative stress-induced free radical overproduction causes cell death without any participation of intracellular Ca^{2+} increase. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1452, n. 2, p. 151–160, 1999.
- ARNÉR, E. S. J.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 20, p. 6102–6109, 2000.
- ARNÉR, E. S. J.; NORDBERG, J.; HOLMGREN, A. Efficient reduction of lipoamide and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 225, n. 1, p. 268–274, 1996.
- BAE, S. J.; LEE, J. S.; KIM, J. M.; LEE, E. K.; HAN, Y. K.; KIM, H. J.; CHOI, J.; HA, Y. M.; NO, J.-K.; KIM, Y. H.; YU, B. P.; CHUNG, H. Y. 5-Hydroxytryptophan inhibits tert-butylhydroperoxide (t-BHP)-induced oxidative damage via the suppression of reactive species (RS) and nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) activation on human fibroblast. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 10, p. 6387–6394, 2010.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; DE CÁSSIA GONÇALVES ALFENAS, R.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BARBOSA, N. V.; NOGUEIRA, C. W.; NOGARA, P. A.; de BEM, A. F.; ASCHNER, M.; ROCHA, J. B. T. Organoselenium compounds as mimics of selenoproteins and thiol modifier agents. **Metalomics: Integrated Biometal Science**, v. 9, n. 12, p. 1703–1734, 2017.
- BARTOLINI, D.; PIRODDI, M.; TIDEI, C.; GIOVAGNOLI, S.; PIETRELLA, D.; MANEVICH, Y.; TEW, K. D.; GIUSTARINI, D.; ROSSI, R.; TOWNSEND, D. M.; SANTI, C.; GALLI, F. Reaction kinetics and targeting to cellular glutathione S-transferase of the glutathione peroxidase mimetic PhSeZnCl and its d,l-poly lactide microparticle formulation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 78, p. 56–65, 2015.
- BAXTER, P. S.; HARDINGHAM, G. E. Adaptive regulation of the brain's antioxidant defences by neurons and astrocytes. **Free Radical**

Biology and Medicine, v. 100, p. 147–152, 2016.

BIENERT, G. P.; MØLLER, A. L. B.; KRISTIANSEN, K. A.; SCHULZ, A.; MOLLER, I. M.; SCHJOERRING, J. K.; JAHN, T. P. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 2, p. 1183–1192, 2007.

BOLAÑOS, J. P.; ALMEIDA, A.; MONCADA, S. Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, n. 3, p. 145–149, 2010.

BOLAÑOS, J. P.; MORO, M. A.; LIZASOAIN, I.; ALMEIDA, A. Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: Therapeutic implications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 14, p. 1299–1315, 2009.

BOONE, D. R.; LEEK, J. M.; FALDUTO, M. T.; TORRES, K. E. O.; SELL, L.; PARSLEY, M. A.; COWART, J. C.; UCHIDA, T.; MICCI, M.; DEWITT, D. S.; PROUGH, D. S.; HELLMICH, H. L. Effects of AAV-mediated knockdown of nNOS and GPx-1 gene expression in rat hippocampus after traumatic brain injury. **PLoS One**, v. 12, p. e0185943, 2017.

BORCHERT, A.; CHI, C. W.; UFER, C.; SCHIEBEL, H.; SAVASKAN, N. E.; KUHN, H. The role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase isoforms in murine embryogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 28, p. 19655–19664, 2006.

BOZZO, F.; MIRRA, A.; CARRÌ, M. T. Oxidative stress and mitochondrial damage in the pathogenesis of ALS: new perspectives. **Neuroscience Letters**, v. 636, p. 3–8, 2017.

BRAND, M. D.; NICHOLLS, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. **Biochemical Journal**, v. 435, n. 2, p. 297–312, 2011.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 5, p. 3289–3303, 2013.

BURKE-GAFFNEY, A.; CALLISTER, M. E. J.; NAKAMURA, H. Thioredoxin: Friend or foe in human disease? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 8, p. 398–404, 2005.

CARVALHO, N. R.; DA ROSA, E. F.; DA SILVA, M. H.; TASSI, C. C.; DALLA CORTE, C. L.; CARBAJO-PESCADOR, S.; MAURIZ, J. L.; GONZALEZ-GALLEGO, J.; SOARES, F. A. New therapeutic approach: diphenyl diselenide reduces mitochondrial dysfunction in acetaminophen-induced acute liver failure. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e81961, 2013.

CASAÑAS-SÁNCHEZ, V.; PÉREZ, J. A.; FABELO, N.; HERRERA-HERRERA, A. V.; FERNÁNDEZ, C.; MARÍN, R.; GONZÁLEZ-

- MONTELONGO, M. C.; DÍAZ, M. Addition of docosahexaenoic acid, but not arachidonic acid, activates glutathione and thioredoxin antioxidant systems in murine hippocampal HT22 cells: potential implications in neuroprotection. **Journal of Neurochemistry**, v. 131, n. 4, p. 470–483, 2014.
- CHAE, H. Z.; KIM, H. J.; KANG, S. W.; RHEE, S. G. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 45, n. 2–3, p. 101–112, 1999.
- CHAUDIERE, J.; WILHELMSSEN, E. C.; TAPPEL, A. L. Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acids and other mercaptans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 2, p. 1043–1050, 1984.
- CHEN, M.; GU, H.; YE, Y.; LIN, B.; SUN, L.; DENG, W.; ZHANG, J.; LIU, J. Protective effects of hesperidin against oxidative stress of tert-butyl hydroperoxide in human hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 10, p. 2980–2987, 2010.
- COLLE, D.; SANTOS, D. B.; HARTWIG, J. M.; GODOI, M.; BRAGA, A. L.; FARINA, M. Mitochondrion Succinobucol versus probucol: higher efficiency of succinobucol in mitigating 3-NP-induced brain mitochondrial dysfunction and oxidative stress in vitro. **Mitoch**, v. 13, n. 2, p. 125–133, 2013a.
- COLLE, D.; SANTOS, D. B.; MOREIRA, E. L. G.; HARTWIG, J. M.; DOS SANTOS, A. A.; ZIMMERMANN, L. T.; HORT, M. A.; FARINA, M. Probutol increases striatal glutathione peroxidase activity and protects against 3-nitropropionic acid-induced pro-oxidative damage in rats. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. 1–15, 2013b.
- COLLE, D.; SANTOS, D. B.; HARTWIG, J. M.; GODOI, M.; ENGEL, D. F.; de BEM, A. F.; BRAGA, A. L.; FARINA, M. 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, n. 2, p. 1280–1295, 2016.
- COYLE, J. T.; PUTTFARCKEN, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science**, v. 262, n. 5134, p. 689–695, 1993.
- CRACK, P. J.; TAYLOR, J. M.; FLENTJAR, N. J.; DE HAAN, J.; HERTZOG, P.; IANNELLO, R. C.; KOLA, I. Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to ischemia/reperfusion injury. **Journal of Neurochemistry**, v. 78, n. 6, p. 1389–1399, 2001.
- CRANE, D.; HÜUSSINGER, D.; GRAF, P.; SIES, H. Decreased flux

- through pyruvate dehydrogenase by thiol oxidation during t-Butyl hydroperoxide metabolism in perfused rat liver. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie**, v. 364, n. 2, p. 977–988, 1983.
- DA ROCHA, J. T.; GAI, B. M.; PINTON, S.; SAMPAIO, T. B.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G. Effects of diphenyl diselenide on depressive-like behavior in ovariectomized mice submitted to subchronic stress: involvement of the serotonergic system. **Psychopharmacology**, v. 222, n. 4, p. 709–719, 2012.
- DAVIES, M. J. Detection of peroxy and alkoxy radicals produced by reaction of hydroperoxides with rat liver microsomal fractions. **The Biochemical Journal**, v. 257, n. 2, p. 603–606, 1989.
- DAVIS, J. B.; MAHER, P. Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. **Brain Research**, v. 652, n. 1, p. 169–173, 1994.
- DAWSON, D. A.; MASAYASU, H.; GRAHAM, D. I.; MACRAE, I. M. The neuroprotective efficacy of ebselen (a glutathione peroxidase mimic) on brain damage induced by transient focal cerebral ischaemia in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 185, n. 1, p. 65–69, 1995.
- de BEM, A. F.; FIUZA, B.; CALCERRADA, P.; BRITO, P. M.; PELUFFO, G.; DINIS, T. C. P.; TRUJILLO, M.; ROCHA, J. B. T.; RADI, R.; ALMEIDA, L. M. Protective effect of diphenyl diselenide against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: a comparison with ebselen. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 31, p. 20–30, 2013.
- DE RIJK, M. C.; BRETELER, M. M.; DEN BREEIJEN, J. H.; LAUNER, L. J.; GROBBEE, D. E.; VAN DER MECHE, F. G.; HOFMAN, A. Dietary antioxidants and Parkinson disease. The Rotterdam Study. **Archives of Neurology**, v. 54, n. 6, p. 762–765, 1997.
- DELUCIA, A. J.; MUSTAFA, M. G.; HUSSAIN, M. Z.; CROSS, C. E. Ozone interaction with rodent lung. III. Oxidation of reduced glutathione and formation of mixed disulfides between protein and nonprotein sulfhydryls. **Journal of Clinical Investigation**, v. 55, n. 4, p. 794–802, 1975.
- DI DOMENICO, F.; BARONE, E.; PERLUIGI, M.; BUTTERFIELD, D. A. Strategy to reduce free radical species in Alzheimer's disease: an update of selected antioxidants. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 15, n. 1, p. 19–40, 2015.
- DIAS, G. R. M.; DE ALMEIDA, T. M.; SUDATI, J. H.; DOBRACHINSKI, F.; PAVIN, S.; SOARES, F. A. A.; NOGUEIRA, C. W.; BARBOSA, N. B. V. Diphenyl diselenide supplemented diet reduces depressive-like behavior in hypothyroid female rats. **Physiology and Behavior**, v. 124, p. 116–122, 2014.

- DOBACHINSKI, F.; DA SILVA, M. H.; TASSI, C. L. C.; DE CARVALHO, N. R.; DIAS, G. R. M.; GOLOMBIESKI, R. M.; DA SILVA LORETO, É. L.; DA ROCHA, J. B. T.; FIGHERA, M. R.; SOARES, F. A. A. Neuroprotective effect of diphenyl diselenide in a experimental stroke model: maintenance of redox system in mitochondria of brain regions. **Neurotoxicity Research**, v. 26, n. 4, p. 317–330, 2014.
- DONG, J.; SULIK, K. K.; CHEN, S. Y. Nrf2-mediated transcriptional induction of antioxidant response in mouse embryos exposed to ethanol *in vivo*: implications for the prevention of fetal alcohol spectrum disorders. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, n. 12, p. 2023–2033, 2008.
- DRAHOTA, Z.; KŘIVÁKOVÁ, P.; ČERVINKOVÁ, Z.; KMONÍČKOVÁ, E.; LOTKOVÁ, H.; KUČERA, O.; HOUŠTĚK, J. Tert-butyl hydroperoxide selectively inhibits mitochondrial respiratory-chain enzymes in isolated rat hepatocytes. **Physiological Research**, v. 54, n. 1, p. 67–72, 2005.
- DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathion in brain. **Progress in Neurobiology**, v. 62, p. 33–57, 2000.
- DUNNING, S.; UR REHMAN, A.; TIEBOSCH, M. H.; HANNIVOORT, R. A.; HAIJER, F. W.; WOUDEBERG, J.; VAN DEN HEUVEL, F. A. J.; BUIST-HOMAN, M.; FABER, K. N.; MOSHAGE, H. Glutathione and antioxidant enzymes serve complementary roles in protecting activated hepatic stellate cells against hydrogen peroxide-induced cell death. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 12, p. 2027–2034, 2013.
- EDMUNDS, R. C.; MCINTYRE, J. K.; ADAM LUCKENBACH, J.; BALDWIN, D. H.; INCARDONA, J. P. Toward enhanced MIQE compliance: reference residual normalization of qPCR gene expression data. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 25, n. 2, p. 54–60, 2014.
- ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, p. 70–77, 1959.
- FARINA, M.; CAMPOS, F.; VENDRELL, I.; BERENQUER, J.; BARZI, M.; PONS, S.; SUÑOL, C. Probuco increases glutathione peroxidase-1 activity and displays long-lasting protection against methylmercury toxicity in cerebellar granule cells. **Toxicological Sciences**, v. 112, n. 2, p. 416–426, 2009.
- FEINBERG, M. W. OutFOXing myeloid cells in atherosclerosis with FoxOs. **Circulation Research**, v. 112, n. 7, p. 978–982, 2013.
- FERNANDEZ-FERNANDEZ, S.; ALMEIDA, A.; BOLAÑOS, J. P. Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. **Biochemical Journal**, v. 443, n. 1, p. 3–11, 2012.
- FERNANDEZ-MARCOS, P.; AUWERX, J. Regulation of PGC-1 α , a

nodal regulator of mitochondrial biogenesis. **The American Society for Clinical Nutrition**, v. 93, n. 4, p. 884–890, 2011.

FIUZA, B.; SUBELZÚ, N.; CALCERRADA, P.; STRALIOTTO, M. R.; PIACENZA, L.; CASSINA, A.; ROCHA, J. B. T.; RADÍ, R.; de BEM, A. F.; PELUFFO, G. Impact of SIN-1-derived peroxynitrite flux on endothelial cell redox homeostasis and bioenergetics: protective role of diphenyl diselenide via induction of peroxiredoxins. **Free Radical Research**, v. 49, n. 2, p. 122–132, 2015.

FLINT, D. H.; TUMINELLO, J. F.; EMPTAGE, M. H. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 30, p. 22369–22376, 1993.

FLOWERS, S.; XU, F.; MORAN, E. Cooperative activation of tissue-specific genes by pRB and E2F1. **Cancer Research**, v. 73, n. 7, p. 2150–2158, 2013.

FREEMAN, B. A.; BAKER, P. R. S.; SCHOPFER, F. J.; WOODCOCK, S. R.; NAPOLITANO, A.; D'ISCHIA, M. Nitro-fatty acid formation and signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 23, p. 15515–15519, 2008.

FRIEDMAN, J. Why is the nervous system vulnerable to oxidative stress? In: GADOTH, N.; GÖBEL, H. (Ed.). *Oxidative Stress and Free Radical Damage in Neurology*. 1. ed. New York. Humana Press, 2011. p. 19–27.

FUKUI, M.; SONG, J. H.; CHOI, J.; CHOI, H. J.; ZHU, B. T. Mechanism of glutamate-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 617, n. 1–3, p. 1–11, 2009.

FURUYAMA, T.; NAKAZAWA, T.; NAKANO, I.; MORI, N. Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. **The Biochemical Journal**, v. 349, p. 629–634, 2000.

GANDHI, S.; ABRAMOV, A. Y. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1–11, 2012.

GANGULY, G.; CHAKRABARTI, S.; CHATTERJEE, U.; SASO, L. Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: cross talk in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 797–810, 2017.

GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. **Neuropharmacology**, v. 40, n. 8, p. 959–975, 2001.

GILLE, J. J. P.; JOENJE, H. Cell culture models for oxidative stress: superoxide and hydrogen peroxide versus normobaric hyperoxia.

- Mutation Research DNAging**, v. 275, n. 3–6, p. 405–414, 1992.
- GLASER, V.; MARTINS, R. D. P.; VIEIRA, A. J. H.; OLIVEIRA, E. D. M.; STRALIOTTO, M. R.; MUKDSI, J. H.; TORRES, A. I.; de BEM, A. F.; FARINA, M.; DA ROCHA, J. B. T.; DE PAUL, A. L.; LATINI, A. Diphenyl diselenide administration enhances cortical mitochondrial number and activity by increasing hemeoxygenase type 1 content in a methylmercury-induced neurotoxicity mouse model. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 390, n. 1–2, p. 1–8, 2014.
- GOEMAERE, J.; KNOOPS, B. Peroxiredoxin distribution in the mouse brain with emphasis on neuronal populations affected in neurodegenerative disorders. **Journal of Comparative Neurology**, v. 520, n. 2, p. 258–280, 2012.
- GRANVILLE, D. J.; GOTTLIEB, R. A. Mitochondria: regulators of cell death and survival. **TheScientificWorldJournal**, v. 2, p. 1569–1578, 2002.
- GREER, E. L.; BRUNET, A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. **Oncogene**, v. 24, n. 50, p. 7410–7425, 2005.
- GROSSMANN, A.; WENDEL, A. Non-reactivity of the selenoenzyme glutathione peroxidase with enzymatically hydroperoxidized phospholipids. **European Journal of Biochemistry**, v. 135, n. 3, p. 549–552, 1983.
- HADDAD, J. J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. **Cellular Signalling**, v. 14, n. 11, p. 879–897, 2002.
- HAIDARA, K.; MOREL, I.; ABALÉA, V.; GASCON BARRÉ, M.; DENIZEAU, F. Mechanism of tert-butylhydroperoxide induced apoptosis in rat hepatocytes: Involvement of mitochondria and endoplasmic reticulum. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1542, n. 1–3, p. 173–185, 2002.
- HAJIEVA, P.; BAYATTI, N.; GRANOLD, M.; BEHL, C.; MOOSMANN, B. Membrane protein oxidation determines neuronal degeneration. **Journal of Neurochemistry**, v. 133, n. 3, p. 352–367, 2015.
- HE, W.; GOODKIND, D.; KOWAL, P. U.S. **Census Bureau, International Population Reports, P95/16-1, An Aging World : 2015**. U.S. Government Publishing Office, Washington, DC, 2016. p. 1–160.
- HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 214–226, 1976.
- HORT, M. A.; STRALIOTTO, M. R.; DE OLIVEIRA, J.; AMOÊDO, N.

- D.; DA ROCHA, J. B. T.; GALINA, A.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; de BEM, A. F. Diphenyl diselenide protects endothelial cells against oxidized low density lipoprotein-induced injury: Involvement of mitochondrial function. **Biochimie**, v. 105, p. 172–181, 2014.
- HU, Y.; WANG, S.; WANG, A.; LIN, L.; CHEN, M.; WANG, Y. Antioxidant and hepatoprotective effect of *Penthorum chinense* pursh extract against t-BHP-induced liver damage in L02 cells. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6443–6453, 2015.
- ISLAM, M. T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. **Neurological Research**, v. 39, n. 1, p. 73–82, 2017.
- ISONAKA, R.; HIRUMA, H.; KAWAKAMI, T. Inhibition of axonal transport caused by tert-butyl hydroperoxide in cultured mouse dorsal root ganglion neurons. **J Mol Neurosci**, v. 45, n. 2, p. 194–201, 2011.
- JACK, C. R.; PETERSEN, R. C.; XU, Y. C.; OBRIEN, P. C.; WARING, S. C.; TANGALOS, E. G.; SMITH, G. E.; IVNIK, R. J.; THIBODEAU, S. N.; KOKMEN, E. Hippocampal atrophy and apolipoprotein e genotype are independently associated with alzheimers-disease. **Annals of Neurology**, v. 43, n. 3, p. 303–310, 1998.
- JIN, H.; KANTHASAMY, A.; GHOSH, A.; ANANTHARAM, V.; KALYANARAMAN, B.; KANTHASAMY, A. G. Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of Parkinson's disease: preclinical and clinical outcomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 8, p. 1282–1294, 2014.
- JIRÁSEK, P.; AMSLINGER, S.; HEILMANN, J. Synthesis of natural and non-natural curcuminoids and their neuroprotective activity against glutamate-induced oxidative stress in HT-22 cells. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 10, p. 2206–2217, 2014.
- JORNSTEDT, M. B.; KUMAR, S.; HOLMGREN, A. Selenite and selenodiglutathione: reactions with thioredoxin systems. **Methods in Enzymology**, v. 252, n. 1984, p. 209–219, 1995.
- JOSEY, B. J.; INKS, E. S.; WEN, X.; CHOU, C. J. Structure – activity relationship study of vitamin K derivatives yields highly potent neuroprotective agents. **J. Med. Chem.**, v. 56, p. 1007–1022, 2013.
- KAJA, S.; DUNCAN, R. S.; LONGORIA, S.; HILGENBERG, J. D.; PAYNE, A. J.; DESAI, N. M.; PARIKH, R. A.; BURROUGHS, S. L.; GREGG, E. V.; GOAD, D. L.; KOULEN, P. Novel mechanism of increased Ca^{2+} release following oxidative stress in neuronal cells involves type 2 inositol-1,4,5-trisphosphate receptors. **Neuroscience**, v. 175, p. 281–291, 2011.
- KANG, T.-H.; BAEK, H.-Y.; KIM, Y.-C. Protective effect of jakyak-

- gamcho-tang extract and its constituents against t-BHP-induced oxidative damage in HT22 cells. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 33, n. 2, p. 181–189, 2005.
- KANUPRIYA; PRASAD, D.; SAI RAM, M.; SAWHNEY, R. C.; ILAVAZHAGAN, G.; BANERJEE, P. K. Mechanism of tert-butylhydroperoxide induced cytotoxicity in U-937 macrophages by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 5, p. 846–854, 2007.
- KIM, G. H.; KIM, J. E.; RHIE, S. J.; YOON, S. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Experimental Neurobiology**, v. 24, n. 4, p. 325–340, 2015.
- KIM, S. C.; LEE, J. R.; PARK, S. J. Role of 6-Shogaol in *tert*-butyl hydroperoxide-induced apoptosis of HepG2 cells. **Pharmacology**, v. 93, n. 3–4, p. 137–144, 2014.
- KISH, S. J.; MORITO, C.; HORNYKIEWICZ, O. Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease brain. **Neuroscience Letters**, v. 58, n. 3, p. 343–346, 1985.
- KLOTZ, L. O.; SÁNCHEZ-RAMOS, C.; PRIETO-ARROYO, I.; URBÁNEK, P.; STEINBRENNER, H.; MONSALVE, M. Redox regulation of FoxO transcription factors. **Redox Biology**, v. 6, p. 51–72, 2015.
- KRISKA, T.; LEVCHENKO, V. V.; CHU, F. F.; ESWORTHY, R. S.; GIROTTI, A. W. Novel enrichment of tumor cell transfectants expressing high levels of type 4 glutathione peroxidase using 7 α -hydroperoxycholesterol as a selection agent. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 5, p. 700–707, 2008.
- KUČERA, O.; ENDLICHER, R.; ROUŠAR, T.; LOTKOVÁ, H.; GARNOL, T.; DRAHOTA, Z.; ČERVINKOVÁ, Z. The effect of tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress on lean and steatotic rat hepatocytes *in vitro*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1–12, 2014.
- KUMARI, S.; MEHTA, S. L.; LI, P. A. Glutamate induces mitochondrial dynamic imbalance and autophagy activation: preventive effects of selenium. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e39382, 2012.
- KURAUCHI, Y.; HISATSUNE, A.; ISOHAMA, Y.; MISHIMA, S.; KATSUKI, H. Caffeic acid phenethyl ester protects nigral dopaminergic neurons via dual mechanisms involving haem oxygenase-1 and brain-derived neurotrophic factor. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, n. 3, p. 1151–1168, 2012.
- KWON, M. S.; WOO, S. K.; KURLAND, D. B.; YOON, S. H.; PALMER, A. F.; BANERJEE, U.; IQBAL, S.; IVANOVA, S.;

- GERZANICH, V.; SIMARD, J. M. Methemoglobin is an endogenous Toll-like receptor 4 ligand-relevance to subarachnoid hemorrhage. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 5028–5046, 2015.
- LEE, D. S.; CHA, B. Y.; WOO, J. T.; KIM, Y. C.; JANG, J. H. Acerogenin A from *Acer nikoense* maxim prevents oxidative stress-induced neuronal cell death through Nrf2-mediated heme oxygenase-1 expression in mouse hippocampal HT22 cell line. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 12545–12557, 2015.
- LEE, D. S.; KIM, K. S.; KO, W.; LI, B.; JEONG, G. S.; JANG, J. H.; OH, H.; KIM, Y. C. The cytoprotective effect of sulfuretin against tert-Butyl hydroperoxide-induced hepatotoxicity through Nrf2/ARE and JNK/ERK MAPK-mediated Heme Oxygenase-1 expression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 5, p. 8863–8877, 2014.
- LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 787–795, 2006.
- LIU, J.; LI, L.; SUO, W. Z. HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. **Life Sciences**, v. 84, n. 9–10, p. 267–271, 2009.
- LIU, Z.; ZHOU, T.; ZIEGLER, A. C.; DIMITRION, P.; ZUO, L. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from molecular mechanisms to clinical applications. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–11, 2017.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LU, S. Glutathione Synthesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 5, p. 3143–3153, 2014.
- LUBOS, E.; LOSCALZO, J.; HANDY, D. E. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 7, p. 1957–1997, 2011.
- LUCHESE, C.; BRANDÃO, R.; DE OLIVEIRA, R.; NOGUEIRA, C. W.; SANTOS, F. W. Efficacy of diphenyl diselenide against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium in mice. **Toxicology Letters**, v. 173, n. 3, p. 181–190, 2007.
- LUNDSTROM, J.; HOLMGREN, A. Protein disulfide-isomerase is a substrate for thioredoxin reductase and has thioredoxin-like activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 16, p. 9114–9120, 1990.
- LV, H.; LIU, Q.; ZHOU, J.; TAN, G.; DENG, X.; CI, X. Daphnetin-mediated Nrf2 antioxidant signaling pathways ameliorate tert-butyl

- hydroperoxide (t-BHP)-induced mitochondrial dysfunction and cell death. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 106, p. 38–52, 2017.
- LYAKHOVICH, A.; GRAIFER, D. Mitochondria-mediated oxidative stress: old target for new drugs. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 26, p. 3040–3053, 2015.
- MAILLOUX, R. J.; MCBRIDE, S. L.; HARPER, M. E. Unearthing the secrets of mitochondrial ROS and glutathione in bioenergetics. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 38, n. 12, p. 592–602, 2013.
- MAIORINO, M.; GREGOLIN, C.; URSINI, F. B. T.-M. in E. [47] Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. In: SIES, H.; GLAZER, A. (Ed.). **Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants**. 1 ed. Academic Press, 1990. 186p. 448–457.
- MANDAL, P. K.; SAHARAN, S.; TRIPATHI, M.; MURARI, G. Brain glutathione levels - a novel biomarker for mild cognitive impairment and alzheimer's disease. **Biological Psychiatry**, v. 78, n. 10, p. 702–710, 2015.
- MANN, G. E.; BONACASA, B.; ISHII, T.; SIOW, R. C. Targeting the redox sensitive Nrf2-Keap1 defense pathway in cardiovascular disease: protection afforded by dietary isoflavones. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 2, p. 139–145, 2009.
- MANOLOV, V. The Role of Iron Homeostasis in Alzheimer's Disease. **Alzheimer's and Neurodegenerative Diseases**, v. 3, n. 1, p. 1–4, 2017.
- MARINKOVIC, D.; ZHANG, X.; YALCIN, S.; LUCIANO, J. P.; BRUGNARA, C.; HUBER, T.; GHAFFARI, S. Foxo3 is required for the regulation of oxidative stress in erythropoiesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 8, p. 2133–2144, 2007.
- MARTÍN, C.; MARTÍNEZ, R.; NAVARRO, R.; RUIZ-SANZ, J. I.; LACORT, M.; RUIZ-LARREA, M. B. tert-Butyl hydroperoxide-induced lipid signaling in hepatocytes: Involvement of glutathione and free radicals. **Biochemical Pharmacology**, v. 62, n. 6, p. 705–712, 2001.
- MASON, R. P.; CASU, M.; BUTLER, N.; BREDI, C.; CAMPESAN, S.; CLAPP, J.; GREEN, E. W.; DHULKHED, D.; KYRIACOU, C. P.; GIORGINI, F. Glutathione peroxidase activity is neuroprotective in models of Huntington's disease. **Nature Genetics**, v. 45, n. 10, p. 1249–1254, 2013.
- MAY, J. M.; COBB, C. E.; MENDIRATTA, S.; HILL, K. E.; BURK, R. F. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 36, p. 23039–23045, 1998.
- MAY, J. M.; MENDIRATTA, S.; HILL, K. E.; BURK, R. F. Reduction

of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 36, p. 22607–22610, 1997.

MCDOWELL, I.; BRENNAN, G.; MCENENY, J.; YOUNG, I.; NICHOLLS, D.; MCVEIGH, G.; BRUCE, I.; TRIMBLE, E.; JOHNSTON, G. 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, n. 11, p. 759–765, 1994.

MEINERZ, D. F.; BRANCO, V.; ASCHNER, M.; CARVALHO, C.; ROCHA, J. B. T. Diphenyl diselenide protects against methylmercury-induced inhibition of thioredoxin reductase and glutathione peroxidase in human neuroblastoma cells: a comparison with ebselen. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 9, p. 1073–1081, 2017.

MIYAMOTO, N.; IZUMI, H.; MIYAMOTO, R.; KUBOTA, T.; TAWARA, A.; SASAGURI, Y.; KOHNO, K. Nipradilol and timolol induce Foxo3a and peroxiredoxin 2 expression and protect trabecular meshwork cells from oxidative stress. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 50, n. 6, p. 2777–2784, 2009.

MONTGOMERY, M. K.; TURNER, N. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. **Endocrine Connections**, v. 4, n. 1, p. R1–R15, 2014.

MOODLEY, K. K.; CHAN, D. The hippocampus in neurodegenerative disease. **The Hippocampus in Clinical Neuroscience**, v. 34, p. 95–108, 2014.

MOOSMANN, B.; SKUTELLA, T.; BEYER, K.; BEHL, C. Protective activity of aromatic amines and imines against oxidative nerve cell death. **Biological Chemistry**, v. 382, n. 11, p. 1601–1612, 2001.

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

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v. 417, n. 1, p. 1–13, 2009.

MUSTAFA, M. General Enzymology of the Lung. In: WITSCHI, H. P.; BRAIN, J. D. (Ed.). **Toxicology of Inhaled Materials: General Principles of Inhalation Toxicology**. 1. ed. Munich. Springer Berlin Heidelberg, 1985. p. 369–419.

NIEMINEN, A.; BYRNE, A.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J. J. Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species. **The American Journal of Physiology**, v. 272, p. C1286–C1294, 1997.

- NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Diphenyl diselenide a janus-faced molecule. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 11, p. 2055–2071, 2010.
- NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 11, p. 1313–1359, 2011.
- PANEE, J.; STOYTCHIEVA, Z. R.; LIU, W.; BERRY, M. J. Selenoprotein H is a redox-sensing high mobility group family DNA-binding protein that up-regulates genes involved in glutathione synthesis and phase II detoxification. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 33, p. 23759–23765, 2007.
- PENG, G.-P.; FENG, Z.; HE, F.-P.; CHEN, Z.-Q.; LIU, X.-Y.; LIU, P.; LUO, B.-Y. Correlation of hippocampal volume and cognitive performances in patients with either mild cognitive impairment or alzheimer's disease. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 21, p. 1–8, 2014.
- PERRON, N. R.; BEESON, C.; ROHRER, B. Early alterations in mitochondrial reserve capacity; a means to predict subsequent photoreceptor cell death. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 45, n. 1–2, p. 101–109, 2013.
- PERRON, N. R.; BRUMAGHIM, J. L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 53, n. 2, p. 75–100, 2009.
- PFEIFFER, A.; JAECKEL, M.; LEWERENZ, J.; NOACK, R.; POUYA, A.; SCHACHT, T.; HOFFMANN, C.; WINTER, J.; SCHWEIGER, S.; SCHÄFER, M. K. E.; METHNER, A. Mitochondrial function and energy metabolism in neuronal HT22 cells resistant to oxidative stress. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 8, p. 2147–2158, 2014.
- PIRET, J. P.; ARNOULD, T.; FUKS, B.; CHATELAIN, P.; REMACLE, J.; MICHIELS, C. Mitochondria permeability transition-dependent tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis in hepatoma HepG2 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, n. 4, p. 611–620, 2004.
- POSSER, T.; FRANCO, J. L.; DOS SANTOS, D. A.; RIGON, A. P.; FARINA, M.; DAFRÉ, A. L.; TEIXEIRA ROCHA, J. B.; LEAL, R. B. Diphenyl diselenide confers neuroprotection against hydrogen peroxide toxicity in hippocampal slices. **Brain Research**, v. 1199, p. 138–147, 2008.
- POTEET, E.; WINTERS, A.; YAN, L. J.; SHUFELT, K.; GREEN, K. N.; SIMPKINS, J. W.; WEN, Y.; YANG, S. H. Neuroprotective actions of methylene blue and its derivatives. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e48279, 2012.

- POWER, J. H. T.; BLUMBERGS, P. C. Cellular glutathione peroxidase in human brain: cellular distribution, and its potential role in the degradation of Lewy bodies in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. **Acta Neuropathologica**, v. 117, n. 1, p. 63–73, 2009.
- QUISPE, R. L.; CANTO, R. F. S.; JARAMILLO, M. L.; BARBOSA, F. A. R.; BRAGA, A. L.; de BEM, A. F.; FARINA, M. Design, synthesis, and in vitro evaluation of a novel probucol derivative: protective activity in neuronal cells through GPx upregulation. **Molecular Neurobiology**, 2018.
- RHEE, S. G.; CHAE, H. Z.; KIM, K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. **Free radical biology & medicine**, v. 38, n. 12, p. 1543–1552, 2005.
- RIBEIRO, R. P.; MOREIRA, E. L. G.; SANTOS, D. B.; COLLE, D.; DOS SANTOS, A. A.; PERES, K. C.; FIGUEIREDO, C. P.; FARINA, M. ProbucoL affords neuroprotection in a 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 3, p. 660–668, 2013.
- RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458–1461, 2006.
- ROCHA, J. B. T.; PICCOLI, B. C.; OLIVEIRA, C. S. Biological and chemical interest in selenium: a brief historical account. **Arkivoc**, p. 457–491, 2017.
- RUAN, Q.; RUAN, J.; ZHANG, W.; QIAN, F.; YU, Z. Targeting NAD⁺ degradation: the therapeutic potential of flavonoids for Alzheimer's disease and cognitive frailty. **Pharmacological Research**, 2017. doi: 10.1016/j.phrs.2017.08.010.
- SALVI, A.; PATKI, G.; KHAN, E.; ASGHAR, M.; SALIM, S. Protective effect of tempol on buthionine sulfoximine-induced mitochondrial impairment in hippocampal derived HT22 cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–8, 2016.
- SAMPAIO, T. B.; PINTON, S.; DA ROCHA, J. T.; GAI, B. M.; NOGUEIRA, C. W. Involvement of BDNF/TrkB signaling in the effect of diphenyl diselenide on motor function in a Parkinson's disease rat model. **European Journal of Pharmacology**, v. 795, p. 28–35, 2017.
- SANDHIR, R.; YADAV, A.; SUNKARIA, A.; SINGHAL, N. Nano-antioxidants: an emerging strategy for intervention against neurodegenerative conditions. **Neurochemistry International**, v. 89, p. 209–226, 2015.
- SANTOS, D. B.; COLLE, D.; MOREIRA, E. L. G.; PERES, K. C.;

- RIBEIRO, R. P.; DOS SANTOS, A. A.; DE OLIVEIRA, J.; HORT, M. A.; de BEM, A. F.; FARINA, M. Probenecol mitigates streptozotocin-induced cognitive and biochemical changes in mice. **Neuroscience**, v. 284, p. 590–600, 2015.
- SANTOS, D. B.; PERES, K. C.; RIBEIRO, R. P.; COLLE, D.; SANTOS, A. A. dos; MOREIRA, E. L. G.; SOUZA, D. O. G.; FIGUEIREDO, C. P.; FARINA, M. Probenecol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid β peptide in mice. **Experimental Neurology**, v. 233, n. 2, p. 767–775, 2012.
- SATOH, T.; REZAIE, T.; SEKI, M.; SUNICO, C. R.; TABUCHI, T.; KITAGAWA, T.; YANAGITAI, M.; SENZAKI, M.; KOSEGAWA, C.; TAIRA, H.; MCKERCHER, S. R.; HOFFMAN, J. K.; ROTH, G. P.; LIPTON, S. A. Dual neuroprotective pathways of a pro-electrophilic compound via HSF-1-activated heat-shock proteins and Nrf2-activated phase 2 antioxidant response enzymes. **Journal of Neurochemistry**, v. 119, n. 3, p. 569–578, 2011.
- SAVASKAN, N. E.; BORCHERT, A.; BRÄUER, A. U.; KUHN, H. Role for glutathione peroxidase-4 in brain development and neuronal apoptosis: specific induction of enzyme expression in reactive astrocytes following brain injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 2, p. 191–201, 2007.
- SCHWARZ, K.; FOLTZ, C. Factor 3 activity of selenium compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 233, n. 1, p. 245–251, 1958.
- SENA, L. A.; CHANDEL, N. S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. **Molecular Cell**, v. 48, n. 2, p. 158–166, 2012.
- SHEN, C.-H.; TUNG, S.-Y.; HUANG, W.-S.; LEE, K.-F.; HSIEH, Y.-Y.; HSIEH, M. C.; CHEN, C.-N.; KUO, H.-C. Comparative proteomic identification of protein disulphide isomerase A6 associated with tert-butylhydroperoxide-induced liver injury in rat hepatocytes. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 1915–1926, 2018.
- SHOKOLENKO, I.; VENEDIKTOVA, N.; BOCHKAREVA, A.; WILSON, G. L.; ALEXEYEV, M. F. Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 8, p. 2539–2548, 2009.
- SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180–183, 2015.
- SIES, H.; JONES, D. Oxidative Stress. **Encyclopedia of Stress**, p. 45–48, 2007.
- SIES, H.; SHAROV, V. S.; KLOTZ, L. O.; BRIVIBA, K. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations: a new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. **Journal of**

- Biological Chemistry**, v. 272, n. 44, p. 27812–27817, 1997.
- SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, p. 715–748, 2017.
- SONEE, M.; MARTENS, J. R.; EVERS, M. R.; MUKHERJEE, S. K. The effect of tertiary butylhydroperoxide and nicotinamide on human cortical neurons. **NeuroToxicology**, v. 24, n. 3, p. 443–448, 2003.
- STOCKER, R. Molecular mechanisms underlying the antiatherosclerotic and antidiabetic effects of probucol, succinobucol, and other probucol analogues. **Current Opinion in Lipidology**, v. 20, n. 3, p. 227–235, 2009.
- STRALIOTTO, M. R. **Estudo dos mecanismos moleculares envolvidos no efeito citoprotetor do disseleneto de difenila em macrófagos e células endoteliais**. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 148 pp. 2016.
- STRALIOTTO, M. R.; HORT, M. A.; FIUZA, B.; ROCHA, J. B. T.; FARINA, M.; CHIABRANDO, G.; de BEM, A. F. Diphenyl diselenide modulates oxLDL-induced cytotoxicity in macrophage by improving the redox signaling. **Biochimie**, v. 95, n. 8, p. 1544–1551, 2013.
- TAFFESS, B. G.; TAKAHASHIN, N.; KENSLERSII, W.; MASONN, R. P. Generation of free radicals from organic hydroperoxide tumor promoters in isolated mouse keratinocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 25, p. 12143–12149, 1987.
- TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondrial regulation of cell death. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 9, p. a008706, 2013.
- TARDIF, J.-C.; GREGOIRE, J.; L'ALLIER, P. L. Prevention of restenosis with antioxidants: mechanisms and implications. **American journal of cardiovascular drugs: drugs, devices, and other interventions**, v. 2, n. 5, p. 323–334, 2002.
- TARDIF, J. C. Clinical results with AGI-1067: A novel antioxidant vascular protectant. **American Journal of Cardiology**, v. 91, n. 3, p. 41–49, 2003.
- TARDIF, J. C.; GRÉGOIRE, J.; SCHWARTZ, L.; TITLE, L.; LARAMÉE, L.; REEVES, F.; LESPÉRANCE, J.; BOURASSA, M. G.; L'ALLIER, P. L.; GLASS, M.; LAMBERT, J.; GUERTIN, M. C. Effects of AGI-1067 and probucol after percutaneous coronary interventions. **Circulation**, v. 107, n. 4, p. 552–558, 2003.
- TEBAY, L. E.; ROBERTSON, H.; DURANT, S. T.; VITALE, S. R.; PENNING, T. M.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; HAYES, J. D. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox

- stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, p. 108–146, 2015.
- TIGHE, R. M.; LI, Z.; POTTS, E. N.; FRUSH, S.; LIU, N.; GUNN, M. D.; FOSTER, W. M.; NOBLE, P. W.; HOLLINGSWORTH, J. W. Ozone inhalation promotes CX3CR1-dependent maturation of resident lung macrophages that limit oxidative stress and inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 9, p. 4800–4808, 2011.
- TOBABEN, S.; GROHM, J.; SEILER, A.; CONRAD, M.; PLESNILA, N.; CULMSEE, C. 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, n. 2, p. 282–292, 2011.
- TOPPO, S.; FLOHÉ, L.; URSINI, F.; VANIN, S.; MAIORINO, M. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1790, n. 11, p. 1486–1500, 2009.
- TRÉPANIÉ, G.; FURLING, D.; PUYMIRAT, J.; MIRAULT, M. E. Immunocytochemical localization of seleno-glutathione peroxidase in the adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 75, n. 1, p. 231–243, 1996.
- TRUJILLO, M.; FERRER-SUETA, G.; THOMSON, L.; FLOHÉ, L.; RADI, R. Kinetics of peroxiredoxins and their role in the decomposition of peroxynitrite. **Sub-cellular biochemistry**, v. 44, p. 83–113, 2007.
- TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of Physiology**, v. 552, n. 2, p. 335–344, 2003.
- URSINI, F.; MAIORINO, M.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; AUMANN, K.; ROVERI, A.; SCHOMBURG, D.; FLOHÉ, L. Diversity of glutathione peroxidases. **Methods in Enzymology**, v. 252, p. 38–53, 1995.
- UTTARA, B.; SINGH, A. V.; ZAMBONI, P.; MAHAJAN, R. T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current Neuropharmacology**, v. 7, n. 1, p. 65–74, 2009.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.
- VAN DER VOS, K. E.; COFFER, P. J. The Extending Network of FOXO Transcriptional Target Genes. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 14, n. 4, p. 579–592, 2011.
- WANG, H.; CHENG, E.; BROOKE, S.; CHANG, P.; SAPOLSKY, R. Over-expression of antioxidant enzymes protects cultured hippocampal

- and cortical neurons from necrotic insults. **Journal of Neurochemistry**, v. 87, n. 6, p. 1527–1534, 2003.
- WANG, M.; ZHU, K.; ZHANG, L.; LI, L.; ZHAO, J. Thioredoxin 1 protects astrocytes from oxidative stress by maintaining peroxiredoxin activity. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 3, p. 2864–2870, 2016.
- WANG, Y.; ZHOU, Y.; GRAVES, D. T. FOXO transcription factors: their clinical significance and regulation. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–13, 2014.
- WENDEL, A. Glutathione Peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325–333, 1981.
- WU, C.; ZHAO, W.; YU, J.; LI, S.; LIN, L.; CHEN, X. Induction of ferroptosis and mitochondrial dysfunction by oxidative stress in PC12 cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 574, 2018.
- WYSS-CORAY, T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. **Nature**, v. 539, n. 7628, p. 180–186, 2016.
- XIA, L.; BJÖRNSTEDT, M.; NORDMAN, T.; ERIKSSON, L. C.; OLSSON, J. M. Reduction of ubiquinone by lipoamide dehydrogenase: an antioxidant regenerating pathway. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 5, p. 1486–1490, 2001.
- YAMAGUCHI, T.; SANO, K.; TAKAKURA, K.; SAITO, I.; SHINOHARA, Y.; ASANO, T.; YASUHARA, H. Ebselen in acute ischemic stroke : a placebo-controlled, double-blind clinical trial. **Stroke**, v. 29, n. 1, p. 12–17, 1998.
- YAMASHITA, S.; HBUJO, H.; ARAI, H.; HARADA-SHIBA, M.; MATSUI, S.; FUKUSHIMA, M.; SAITO, Y.; KITA, T.; MATSUZAWA, Y. Long-term probucol treatment prevents secondary cardiovascular events: a cohort study of patients with heterozygous familial hypercholesterolemia in Japan. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 15, n. 6, p. 292–303, 2008.
- YANG, W.; SHEN, Y.; WEI, J.; LIU, F. MicroRNA-153/Nrf-2/GPx1 pathway regulates radiosensitivity and stemness of glioma stem cells via reactive oxygen species. **Oncotarget**, v. 6, n. 26, p. 22006–22027, 2015.
- YUSOFF, A. A. M.; AHMAD, F.; IDRIS, Z.; JAAFAR, H.; ABDULLAH, J. M. Understanding mitochondrial DNA in brain tumorigenesis. In: LICHTOR, T. (Ed.). **Molecular considerations and evolving surgical management issues in the treatment of patients with a brain tumor**. Rijeka: InTech, 2015. p. 3–28.
- ZAMBERLAN, D. C.; ARANTES, L. P.; MACHADO, M. L.; GOLOMBIESKI, R.; SOARES, F. A. A. Diphenyl-diselenide suppresses amyloid- β peptide in *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 278, p. 40–50, 2014.

ZHAO, K.; LUO, G.; GIANNELLI, S.; SZETO, H. H. Mitochondria-targeted peptide prevents mitochondrial depolarization and apoptosis induced by tert-butyl hydroperoxide in neuronal cell lines. **Biochemical Pharmacology**, v. 70, n. 12, p. 1796–1806, 2005.

ZHONG, L.; ARNER, E. S. J.; HOLMGREN, A. Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: The active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 11, p. 5854–5859, 2000.

ZHOU, Z.; LIU, C.; CHEN, S.; ZHAO, H.; ZHOU, K.; WANG, W. Activation of the Nrf2 / ARE signaling pathway by probucol contributes to inhibiting inflammation and neuronal apoptosis after spinal cord injury. v. 8, n. 32, p. 52078–52093, 2017.

ZHU, X. H.; QIAO, H.; DU, F.; XIONG, Q.; LIU, X.; ZHANG, X.; UGURBIL, K.; CHEN, W. Quantitative imaging of energy expenditure in human brain. **NeuroImage**, v. 60, n. 4, p. 2107–2117, 2012.

13. APÊNDICE

APÊNDICE I: Artigo publicado

Molecular Neurobiology
<https://doi.org/10.1007/s12035-018-0939-6>



Design, Synthesis, and In Vitro Evaluation of a Novel Probucol Derivative: Protective Activity in Neuronal Cells Through GPx Upregulation

Ruth Liliâm Quispe^{1,2} · Rômulo Faria Santos Canto³ · Michael Lorenz Jaramillo⁴ · Flavio Augusto Rocha Barbosa⁵ · Antônio Luiz Braga⁵ · Andreza Fabro de Bem² · Marcelo Farina^{1,2}

Received: 6 November 2017 / Accepted: 28 January 2018
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Recent studies have shown that probucol (PB), a hypocholesterolemic agent with antioxidant and anti-inflammatory properties, presents neuroprotective properties. On the other hand, adverse effects have limited PB's clinical application. Thus, the search for PB derivatives with no or less adverse effects has been a topic of research. In this study, we present a novel organoselenium PB derivative (RC513) and investigate its potential protective activity in an in vitro experimental model of oxidative toxicity induced by *tert*-butyl hydroperoxide (tBuOOH) in HT22 neuronal cells, as well as exploit potential protective mechanisms. tBuOOH exposure caused a significant decrease in the cell viability, which was preceded by (i) increased reactive species generation and (ii) decreased mitochondrial maximum oxygen consumption rate. RC513 pretreatment (48 h) significantly prevented the tBuOOH-induced decrease of cell viability, RS generation, and mitochondrial dysfunction. Of note, RC513 significantly increased glutathione peroxidase (GPx) activity and mRNA expression of GPx 1, a key enzyme involved in peroxide detoxification. The use of mercaptosuccinic acid, an inhibitor of GPx, significantly decreased the protective activity of RC513 against tBuOOH-induced cytotoxicity in HT22 cells, highlighting the importance of GPx upregulation in the observed protection. In summary, the results showed a significant protective activity of a novel PB derivative against tBuOOH-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction, which was related to the upregulation of GPx. Our results point to RC513 as a promising neuroprotective molecule, even though studies concerning potential beneficial effects and safety aspects of RC513 under in vivo conditions are well warranted.

Keywords Probucol derivative · Glutathione peroxidase · Mitochondrial dysfunction · HT22 cells · tBuOOH

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12035-018-0939-6>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Ruth Liliâm Quispe
ruth.liliam@gmail.com

✉ Marcelo Farina
marcelo.farina@ufsc.br

¹ Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Florianópolis, SC, Brazil

² Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Bloco C, CEP, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

³ Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Florianópolis, SC, Brazil

⁵ Departamento de Química, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

Abbreviations

PB	Probucol
GPx	Glutathione peroxidase
SH	Glutathione
GR	Glutathione reductase
NADPH	β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt reduced
DMSO	Dimethyl sulfoxide
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PI	Propidium iodide
D C F H ₂	2',7'-Dichlorofluorescein diacetate
DA	
tBuOOH	<i>tert</i> -Butyl hydroperoxide
MS	Mercaptosuccinic acid
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
FCCP	Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
FBS	Fetal bovine serum
HBSS	Hank's balanced salt solution
NPSH	Non-protein thiols

Introduction

Oxidative stress is defined as an imbalance between pro-oxidants and antioxidants in favor of the former, leading to the disruption of redox-mediated events and/or molecular damage [1, 2]. Various experimental and clinical studies have reported that oxidative stress and mitochondrial damage are involved in the pathogenesis of several neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, and Huntington's disease [3–5]. Accordingly, some lines of evidence have shown that strategies that mitigate (pro)-oxidative events are useful in preventing neurodegeneration [6–8].

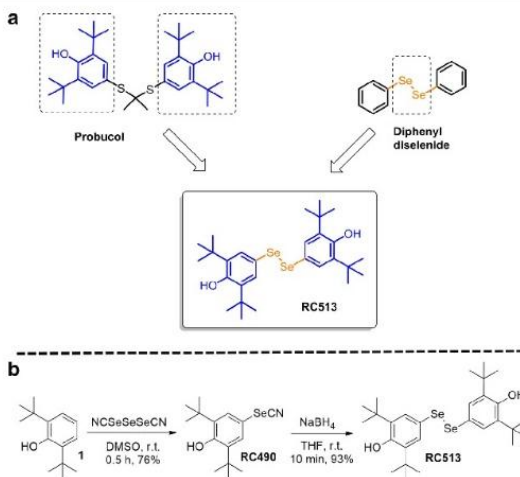
Probucol (PB) is a phenolic lipid-lowering agent with antioxidant and anti-inflammatory properties that has been used in clinical treatment and the prevention of cardiovascular diseases [9]. Of note, neuroprotective effects of this compound have been recently described. For instance, results derived from *in vivo* experiments showed that PB prevented cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by the intracerebroventricular injection of aggregated amyloid β_{1-40} peptide in a mouse model of Alzheimer's disease [10]. Moreover, PB protected against 3-nitropropionic (3-NP) acid-induced pro-oxidative damage in rats in a model of Huntington's disease [11], and protected against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in mice in a model of Parkinson's disease [12]. Protective effects of PB were also observed under *in vitro* conditions in primary cultures of cerebellar neurons exposed to MeHg [13] and rat brain mitochondria-enriched

synaptosomes exposed to 3-NP [14]. On the other hand, the clinical use of PB in humans has been associated with adverse effects, such as reduction of HDL cholesterol [15] and prolongation of cardiac repolarization [16, 17]. In this scenario, new PB derivatives have been synthesized in an attempt to provide compounds that maintain PB's beneficial properties with no (or less) adverse effects [18].

Organoselenium compounds have been recognized for their antioxidant properties. The glutathione peroxidase-like activity has been well documented mainly for the diselenides [19], which have been reported to show neuroprotective effects against hydrogen peroxide and in an experimental stroke model [20, 21]. The beneficial effects of diselenides on the central nervous system are greatly affected by small changes in their chemical structure. For example, diphenyl diselenide can enhance cognitive performance in rodents [22, 23], while its *p*-methoxy analog inhibits acetylcholinesterase activity and protects against A β -induced neurotoxicity in a model of sporadic Alzheimer-type dementia [24–27]. In addition to the glutathione peroxidase-like activity of some organoselenium compounds, it is noteworthy that additional mechanisms have been proposed for their protective effects, such as the ability to oxidize the thiol groups of proteins and to spare selenoproteins from inactivation by soft-electrophiles [28]. Moreover, some organoselenium compounds also display protective effects via induction of peroxiredoxins [29] and activation of Nr2f [30], which regulates genes involved in the cellular antioxidant responses.

HT22, an immortalized murine hippocampal cell line [31], possesses functional cholinergic properties [32] and has been pointed as a useful *in vitro* model to identify potential neuroprotective compounds [33–35]. The exposure of HT22 cells to glutamate and/or pro-oxidative compounds induces a cascade of cellular oxidative events that resemble those observed in neurodegenerative conditions [36–38]. Of particular importance, *tert*-butyl hydroperoxide (tBuOOH), a membrane-permeant organic oxidant, has been reported to cause several of the aforementioned oxidative events in a variety of cells [39–41], including in HT22 cells [42]. Based on previous studies showing neuroprotective effects of PB [10–13], it seems that the search for new PB derivatives could represent a profitable strategy to discover novel neuroprotective compounds. In the current study, we present a newly synthesized probucol derivative, RC513 (Fig. 1), which represents an organoselenium compound (diselenide). We took advantage of cultured HT22 cells to investigate the potential beneficial effects of this new compound against tBuOOH-induced toxicity, as well as to exploit mechanisms mediating these effects. Our results show that RC513 significantly protected neuronal HT22 cells against tBuOOH-induced decrease in cell viability by preventing mitochondrial dysfunction and reactive species generation, and this protection was related to a remarkable increase in glutathione peroxidase (GPx) activity and in the transcript levels of GPx1.

Fig. 1 RC513 compound. **a** Molecular hybridization toward seleno-probucol derivative RC513. **b** Synthesis of the target RC513 compound in room temperature (r.t.)



Materials and Methods

Chemicals

β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt reduced (NADPH), dimethyl sulfoxide (DMSO), glutathione reductase (GR) from baker's yeast, reduced glutathione, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), propidium iodide (PI), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH₂-DA), *tert*-butyl hydroperoxide (tBuOOH), Tri-reagent, mercaptosuccinic acid (MS), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), proton ionophore carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), antimycin A, and oligomycin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Gibco Life Technologies (Carlsbad, CA). MitoSOX™ Red probe was obtained from Invitrogen (USA). RQ1 RNase-Free DNase, GoScript™ Reverse Transcription System, and GoTaq qPCR Master Mix were purchased from Promega Corporation (USA). All other chemicals were of the highest grade available commercially. RC513 was chemically synthesized by using a procedure followed described.

Synthesis of Probucol Derivatives

NMR spectra (¹H NMR and ¹³C NMR) were recorded on a Bruker Avance 200 spectrometer. Chemical shifts (δ) are

reported (in ppm) relative to the TMS (¹H NMR) and the solvent (¹³C NMR). APPI and APCI-microTOF-Q II measurements were performed with a microTOF Q-II (Bruker Daltonics) mass spectrometer equipped with an automatic syringe pump (KD Scientific) for sample injection. The mass spectrometer was operated in the positive ion mode. The sample was injected using a constant flow (3 μL/min). The solvent was a chloroform/methanol mixture. The APPI or APCI-microTOF-Q II instrument was calibrated in the mass range of 50–3000 *m/z* using an internal calibration standard (low-concentration tuning mix solution) supplied by Agilent Technologies. Data were processed employing Bruker Compass Data Analysis software (version 4.0). Column chromatography was carried out using Merck Silica Gel (230–400 mesh). Thin-layer chromatography (TLC) was conducted using Merck Silica Gel GF254 (0.25 mm thickness). For visualization, the TLC plates were either placed under ultraviolet light or stained with iodine vapor or acidic vanillin. All common reagents and solvents were used as purchased unless otherwise noted.

Compound RC513 was synthesized in a two-step synthetic route from 2,6-di-*tert*-butylphenol.

Synthesis of 2,6-di-*tert*-Butyl-4-selenocyanatophenol (RC490)

In a round-bottomed flask, malononitrile (5 mmol) and SeO₂ (10 mmol) were mixed in DMSO (6 mL). The mixture was stirred for 20 min at room temperature, and then, 2,6-di-*tert*-butylphenol (5 mmol) was added. After 30 min, the reaction

mixture was diluted with AcOEt and extracted with water and brine. The organic phase was dried over MgSO_4 , filtered, and evaporated. The crude was purified by column chromatography using hexane as eluent.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) 1.43 (s, 18H), 5.52 (s, 1H), 7.46 (s, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) 29.99, 34.56, 102.59, 110.59, 131.60, 138.38, 155.81. HRMS (APCI-TOF) calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NOSe}$ (M^+) 311.0783, found 311.0785.

Synthesis of 4,4'-Diselanediylylbis(2,6-di-*tert*-butylphenol) (RC513)

In a round-bottomed flask, 2,6-di-*tert*-butyl-4-selenocyanatophenol (RC490, 0.32 mmol) was diluted in THF (3 mL) at room temperature and then NaBH_4 (0.32 mmol) was added. The mixture was stirred for 10 min at room temperature and then 3 mL of a saturated solution of NH_4Cl was added. After 10 min of stirring, the reaction media was diluted with AcOEt and extracted with water and brine. The organic phase was dried over MgSO_4 , filtered, and evaporated. Compound RC513 is sensitive to the light and must be kept refrigerated, in the dark.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) 1.39 (s, 18H), 5.26 (s, 1H), 7.43 (s, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) 30.30, 34.57, 121.39, 130.21, 136.85, 154.37. HRMS (APCI, TOF) calc. for $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_2\text{Se}_2$ 570.1515 (M^+), found 570.1511

Cell Culture

The mouse hippocampal HT22 cell line was gently donated by Dr. David Schubert (Salk Institute, La Jolla, CA, USA). Cells were cultured in growth medium [DMEM medium supplemented with 5% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine, 100 units/mL penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin] at 37 °C in a 5% CO_2 incubator. Cells were subcultured at confluences (80–90%), used between the 3rd and 12th passages.

Treatments

tBuOOH Toxicity

HT22 cells were seeded into 96-well plates with growth medium (described above) at a density of 1×10^3 cells/well at 37 °C in 5% CO_2 . Twenty-four hours after seeding, cells were incubated with 0.05% DMSO (used as vehicle in further experiments) and, after 48 h, cells were exposed to different tBuOOH concentrations (10, 20, 40, 70, and 100 μM) for 12 h. In parallel experiment, cells were exposed to a single tBuOOH concentration (40 μM) for different time points (2, 4, 6, 9, and 12 h). Cell viability assays (described below) were performed.

RC513 Toxicity

Cells were seeded into 96-well plates with growth medium (described above) at a density of 1×10^3 cells/well at 37 °C in 5% CO_2 . Twenty-four hours after seeding, cells were incubated with different RC513 concentrations (1–10 μM , diluted in 0.05% DMSO) for 48 h. Cell viability assays (described below) were performed.

Protection of RC513 Against tBuOOH Toxicity

Cells were seeded into 96-well plates with growth medium (described above) at a density of 1×10^3 cells/well at 37 °C in 5% CO_2 . Twenty-four hours after seeding, cells were incubated with vehicle (DMSO, 0.05%) or different RC513 concentrations (1, 2, and 5 μM) for 48 h. Then, the medium was replaced by fresh medium followed by exposure to tBuOOH (40 μM). Parallel experiments were performed using 5 mM mercaptosuccinic acid (MS, an inhibitor of GPx activity), which was added to the culture medium after the treatment with RC513 (2 μM , for 48 h) and 30 min before the addition of tBuOOH (40, 70, and 100 μM). Twelve hours after tBuOOH treatment, cell viability assays (described below) were performed.

Cell Viability Assays

Cell viability was measured by two different assays, which evaluate different events of the cellular homeostasis. (1) The reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT assay), which assesses the activity of labile mitochondrial dehydrogenases, was conducted as previously described [43]. (2) PI, which is excluded by living cells but rapidly enters cells with damaged membranes and binds to DNA, rendering them brightly fluorescent, was evaluated as previously described [44]. Results of MTT tests were expressed as percentage of untreated cells. Results of PI uptake assays were expressed as percentage of PI uptake (percentage death, where the 100% value represents control cells treated with 2% Triton X-100 for 15 min). All experiments were performed in technical triplicate.

Determination of Reactive Species (RS) Generation

Intracellular RS generation was measured using the (i) DCFH₂-DA probe, conducted as previously described [39], and (ii) mitochondrial superoxide anion generation was measured using a MitoSOX probe. Briefly, HT22 cells at a density of 1×10^3 cells/well were cultured into 96-well plates for 24 h followed by the treatment with RC513 (2 μM) or vehicle (DMSO, 0.05%) for 48 h.

- (i) 1 μM DCFH₂-DA was added to the culture medium, and after 30 min incubation at 37 °C, the medium was removed and changed by fresh Hank's balanced salt solution (HBSS). Cells were exposed to tBuOOH (40, 70, or 100 μM), and the fluorescence intensity, which represents the oxidation of DCFH₂ by RS, was kinetically recorded for 2 h (Spectramax Paradigm) with excitation at 490 nm and emission at 520 nm. The results were expressed as the area under the curve (AUC).
- (ii) Five-micromolar MitoSOX dissolved in medium HBSS was incubated for 15 min at 37 °C. Thereafter, the medium was removed and changed by fresh HBSS. Cells were exposed to tBuOOH (40, 70, or 100 μM) for 4 h, and the fluorescence intensity was recorded in a fluorimetric microplate reader (Spectramax Paradigm) with excitation at 510 nm and emission at 580 nm. The MitoSOX results were expressed as percentage of untreated cells.

Determination of Direct Antioxidant (Scavenger) Activity

The method described by Brand-Williams et al. [45] was used to evaluate the possible direct antioxidant activity of RC513. This method is based on the spectrophotometric measurement of the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) at 517 nm, which disappears upon reduction by an antioxidant (antiradical) compound. RC513 was tested at the final concentration of 25 μM , as well as the positive control (Trolox). The solutions were incubated with a 500- μM DPPH solution for 30 min at room temperature, and spectrophotometer reading was performed at a wavelength of 517 nm. The compounds' capability of reducing DPPH (% antioxidant activity) was calculated using the following equation:

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

where A^1 is the absorbance of the DPPH solution (at 517 nm) without sample and A^2 is the absorbance of the DPPH solution (at 517 nm) with sample.

High-Resolution Respirometry

HT22 cells were seeded into a Petri dish (100 \times 20 mm) at a density of 3×10^5 cells/dish. After 24 h, cells were treated with RC513 (2 μM) or vehicle (DMSO, 0.05%) for 48 h and then exposed to tBuOOH (40 μM) for an additional 2 or 4 h. Approximately one million suspended cells (in DMEM 5% FBS) were charged in OROBOROS Oxygraph-2k chambers. After stabilization of the signal, the basal oxygen consumption rate (OCR) was recorded and cells were incubated with

different substrates, under continuous stirring at 750 rpm at 37 °C, as indicated in the representative experiment (Fig. 5). Basal OCR, which is defined as the oxygen consumption with the physiological substrates present in culture medium, was measured after stabilization of the signal. Afterwards, cells were treated with oligomycin (1.25 μM), and uncoupled OCR (OCR independent of ATP production) was recorded, followed by titration with the proton ionophore carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazine (FCCP—0.5 μM /tritation) for determination of their maximum respiratory capacity (maximum OCR). Respiration was inhibited by application of antimycin A (2.5 μM), which inhibits selectively complex III activity, to determine the non-mitochondrial OCR (residual oxygen consumption—ROX). DatLab software (Oroboros Instruments) was used for data acquisition and analysis.

Measurement of GPx Activity

HT22 cells were seeded at a density 1×10^5 cells/well in six-well plates for 24 h at 37 °C, followed by treatment with RC513 (2 μM) or vehicle (DMSO, 0.05%) for an additional 48 h. Then, the culture medium was removed and cells were washed once with phosphate-buffered saline (PBS). Cells were dissociated with 0.05% trypsin/1 mM EDTA for 2 min, and culture medium (DMEM with 5% FBS) was added (1:1 ratio) to inactivate trypsin. Cells were centrifuged at 500 \times g for 3 min at room temperature, and cell pellets were stored at -80 °C until assays. For assay, cell pellets were resuspended in 50 μL of ice-cold buffer at pH 7.4 (20 mM TrisHCl, 0.25 M sucrose; containing 0.4 mM β -mercaptoethanol) and were sonicated three times by 10 min on ice (vortex of 20 s in each time interval) followed by centrifugation at 10,000 \times g for 15 min at 4 °C. Supernatant was collected after centrifugation, and GPx activity was evaluated according to Wendel [46] and optimized for HT22 cell lysates [47]. The concentrations in the enzyme assay medium were *tert*-butyl hydroperoxide (0.32 mM), GSH (1.88 mM), GR (84 mU), EDTA (1 mM), NaN₃ (1 mM), NADPH (0.2 mM), and Tris-HCl pH 7.6 (0.1 M). Enzyme activity was expressed as nanomoles NADPH consumed per minute per milligram of protein. In another set of experiments, cells (at the same density) were seeded for 24 h at 37 °C followed by treatment with RC513 (2 μM) or vehicle (DMSO, 0.05%) for 43 h; then, the medium was removed and changed by fresh medium. Thereafter, MS (5 mM) was added to the culture medium and incubated for 12 h, followed by the determination of GPx activity as aforementioned.

Determination of Non-protein Thiol (NPSH) Content

Non-protein thiol (NPSH) content was determined using spectrophotometry-based assay as described previously by

Ellman [48]. HT22 cells (1×10^5 cells/well) were seeded in six-well plates. After 24 h, cells were treated with RC513 (2 μ M) or vehicle (DMSO, 0.05%) for 48 h. Then, cells were harvested in 100 μ L of PBS buffer (0.05% Triton X-100, pH 7.4) and mixed with 1:1 trichloroacetic acid 10% solution followed by centrifugation (5000 \times g at 4 $^{\circ}$ C for 10 min); the protein pellet was discarded and supernatant was used in the assay. The absorbance was read at 412 nm in a microplate reader (SpectraMax Paradigm). The values were corrected for milligram protein and expressed as percent of control (vehicle).

Quantification of Transcripts of GPx1 and GPx4 Isoforms

A two-step real-time RT-PCR protocol was performed to measure the transcripts of *Gpx1* and *Gpx4* genes. HT22 cells at a density of 1×10^5 cells/well were seeded in six-well plates. After 24 h, cells were treated with RC513 (2 μ M) or vehicle (DMSO, 0.05%) for 30 h. Total RNA extraction from HT22 cells was performed according to the TRI Reagent (Sigma-Aldrich) protocol. DNase treatment of RNA samples was performed using RQ1 RNase-Free DNase (Promega) at room temperature (25 $^{\circ}$ C) for 1 h. Then, RNA samples were precipitated with acetate sodium (0.3 M) and isopropyl alcohol at room temperature for 10 min followed by centrifugation at 12,000 \times g for 10 min at 4 $^{\circ}$ C. The pellet was washed with 70% alcohol, centrifuged at 12,000 \times g for 10 min at 4 $^{\circ}$ C, dried, and resuspended in diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water. PCR for β -actin gene was performed prior to the cDNA synthesis to verify the absence of DNA contaminants from total RNA samples. Integrity of RNA was evaluated in 1.5% electrophoresis agarose gel. RNA was quantified using a spectrophotometer (BIO-5000-BI/ KASUAKI). A 260/280 and 260/230 absorbance ratio > 1.8 was considered for cDNA synthesis. The cDNA synthesis (20 μ L) was carried out using the GoScriptTM Reverse Transcription System (Promega), according to the manufacturer's instructions, with 1 μ g of total RNA, 0.5 μ g of oligo(dT)₁₅, and 2.5 mM MgCl₂ for each sample. The qPCRs were carried out using GoTaq Mix qPCR Master (Promega) and 96-well reaction plates (Axygen) with the 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The qPCR primer sequences used are shown in Table 1. Primer efficiency was calculated from serial dilutions (1/10, 1/20, 1/40, 1/80 and 1/160) of pooled cDNA according to the equation $E = 10^{(1/-\text{slope})}$. The qPCR (10 μ L) contained 5 μ L of master mix, 1 μ L of diluted cDNA (1/10), 0.3 μ L of each primer (10 μ M), 0.1 μ L of carboxy-X-rhodamine (CXR), and 3.3 μ L of DEPC-water. The qPCR cycling conditions included 2 min at 50 $^{\circ}$ C, 10 min at 95 $^{\circ}$ C, 40 amplification cycles of 15 s at 95 $^{\circ}$ C and 1 min at 60 $^{\circ}$ C, and a melting curve analysis (15 s at 95 $^{\circ}$ C, 15 s at 60 $^{\circ}$ C, and 15 s at 95 $^{\circ}$ C). Negative controls (reaction without sample) were run for each gene. The Cq values were analyzed

using SDS software v2.4 (Applied Biosystems). Transcript levels of *Gpx1* were normalized using *Gapdh* gene and calculated using the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method [51]. The quantification of number copy of cytosolic and mitochondrial *Gpx4* of each sample was realized using Cq values from the curves of plasmid (10^8 to 10^4 copies) containing the *Gpx4* isoforms and *Gapdh* gene [52].

Statistics Analysis

Results were expressed as means \pm SEM. One-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post hoc test was used to compare significant differences among the groups. Student's *t* test was used to compare means in experiments with only two groups. Statistical analyses were performed using the STATISTICA software system, version 7.0. (StatSoft, Inc., 2008). All graphics were made using the GraphPad PRISM[®] software version 6.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Significant differences were statistically considered at the level of $p < 0.05$.

Results

Design and Synthesis of Seleno-Probucol Derivative RC513

Compound RC513 was designed through the use of the molecular hybridization strategy [53, 54], by merging the structures of PB and the bioactive diphenyl diselenide, maintaining its potential pharmacophore groups in the final structure (Fig. 1a).

Synthesis of the target compound RC513 started with the electrophilic aromatic substitution of 2,6-di-tert-butylphenol (1) with triselenodicyanide (NCSeSeSeCN) prepared in situ from SeO₂ and malononitrile [55]. The selenocyanide RC490 was obtained in 76% yield after 30 min reaction at room temperature. RC513 was obtained after deprotection of the selenium atom using NaBH₄ in THF with air oxidation to the respective diselenide [56] in excellent yield (Fig. 1b).

Effect of RC513 on HT22 Cells Exposed to tBuOOH

tBuOOH has been used as oxidative challenge in experimental studies due to its ability to generate free radicals [57] and cause oxidative damage to biological systems, including in HT22 cells [42]. Here, we observed that both tBuOOH-induced decrease of metabolic cell viability (MTT assay, Fig. 2a) and tBuOOH-induced increase in plasma membrane disruption (IP uptake, Fig. 2b) presented a concentration-dependent profile. When cells were exposed to 40 μ M tBuOOH during different periods, a time-dependent profile with significant effects on metabolic cell viability (Fig. 2c) and plasma membrane disruption (Fig. 2d) were observed

Table 1 Primer sequences used for RT-qPCR experiments

Gene		Forward/reverse primer (5'-3')	Amplicon size (bp)	Reference
Gpx1	<i>Glutathione peroxidase 1</i>	CTCACCCGCTCTTACCTTC CAAAGTTCAGGCAATGTCG	129	This study
mtGpx4	<i>Mitochondrial glutathione peroxidase 4</i>	CCGCCGAGATGAGCTGG GTCGATGTCCTGGCTGAG	158	Casañas-Sánchez et al. [49]; this study
mcGpx4	<i>Mitochondrial and cytosolic glutathione peroxidase 4</i>	GTCTGGCAGGCCACCATGT GTCGATGTCCTGGCTGAG	83	This study
Gapdh	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	CATCACTGCCACCCAGAAGA CTG ATGCCAGTGAGCTTCCCGTT CAG	153	Know et al. [50]
Tr2	<i>Thioredoxin reductase 2</i>	GTGTCCTTAGCTCAGCAGGG GGATAAGTGTGGGGCTTCA	164	This study

from 6 and 9 h, respectively. The treatment of cells with RC513, at concentrations that did not significantly decrease cell viability (Fig. 3a, b), completely protected against a tBuOOH-induced decrease of metabolic cell viability (Fig. 3c), as well as against a tBuOOH-induced increase of plasma membrane disruption (Fig. 3d).

Effect of RC513 on the tBuOOH-induced Oxidative Stress in HT22 Cells

Because tBuOOH toxicity is classically related to oxidative stress, we further evaluated whether RC513 protects HT22 cells from tBuOOH-induced reactive species (RS) generation

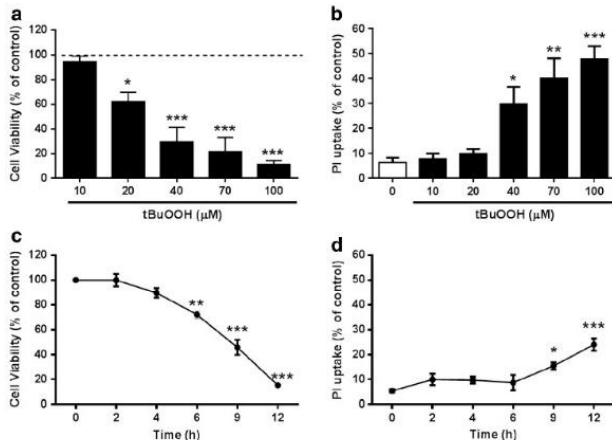


Fig. 2 Concentration and time-dependent effects of tBuOOH on cell viability. HT22 cells were exposed to different tBuOOH concentrations (10–100 μM) for 12 h (a, b) or to 40 μM from 0 to 12 h (c, d). Cell viability was evaluated by the reduction of MTT (a, c) and cell death by IP uptake (b, d). Results of the MTT test are expressed as the percentage of MTT reduction with respect to control values. Results of the IP test are

expressed as percent of IP uptake, where the 100% of cell death value represents control cells treated with 2% Triton X-100 for 15 min. Data are represented as mean ± SEM (a, b; n = 4) (c, d; n = 3). One asterisk, $p < 0.05$; two asterisks, $p < 0.01$; and three asterisks, $p < 0.001$ indicate statistical difference from the control by one-way ANOVA, followed by the Tukey post hoc test.

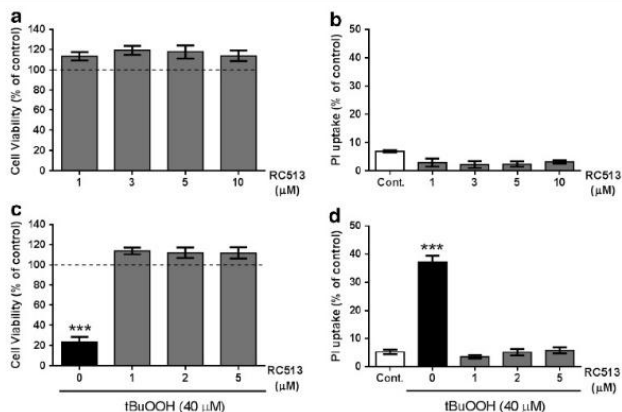


Fig. 3 Effects of RCS13 against tBuOOH-induced toxicity in HT22 cells. **a, b** Determination of non-toxic concentrations of RCS13. HT22 cells were treated with different concentrations of RCS13 (1, 3, 6, and 10 μM) for 48 h followed by cell viability assays. **c, d** RCS13 prevents tBuOOH-induced decrease of cell viability. Cells were treated with a non-toxic low concentration of RCS13 (1, 2, and 5 μM) for 48 h followed by exposure to tBuOOH (40 μM) for 12 h. Cell viability was evaluated by the reduction of MTT (**a** and **c**) and by measuring plasma membrane

disruption via PI uptake (**b** and **d**). Results of the MTT test are expressed as the percentage of MTT reduction with respect to control values (dotted line). Results of PI assays are expressed as percent of PI uptake, where the 100% of cell death value represent cells treated with 2% Triton X-100 for 15 min. Data are represented as mean \pm SEM (**a, b** $n = 3$; **c, d** $n = 6$). Three asterisks, $p < 0.001$, indicate statistical difference from the control (dotted line) in MTT and the control (white bar) in PI uptake assay by one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test. Cont., control

(Fig. 4a). Our results showed that the treatment with RCS13 (2 μM) for 48 h totally prevented the peroxide-induced RS generation at low tBuOOH concentration (40 μM) (Fig. 4b), but partially prevented RS generation at high (70 and 100 μM) tBuOOH concentrations (Fig. 4c, d). Moreover, our results using MitoSOX showed that the treatment with RCS13 (2 μM) for 48 h prevented the peroxide-induced mitochondrial superoxide anion generation at either 40, 70, or 100 μM tBuOOH concentration (Fig. 4e–g).

Effect of RCS13 on Mitochondrial Function in HT22 Cells Exposed to tBuOOH

Because mitochondrial dysfunction represents a common consequence of oxidative stress, we evaluated the potential deleterious effects of tBuOOH (40 μM) on mitochondrial function (cell respiration), as well as the potential beneficial effects of RCS13 (Fig. 5). We observed a significant decrease in the maximum respiratory capacity in HT22 cells even at 2 h after tBuOOH exposure, which was prevented by RCS13 treatment ($p < 0.05$, Fig. 5b). An evident mitochondrial dysfunction was observed after a longer tBuOOH exposure (4 h). The oxidant challenge caused a profound decrease in routine respiration (basal OCR) and in the maximum OCR, which were effectively prevented by RCS13 treatment ($p < 0.001$, Fig. 5c).

Effect of RCS13 on GPx Activity, GPx mRNA Expression, and NPSH Levels in HT22 Cells

Considering the beneficial effects of RCS13 against tBuOOH-induced RS generation in HT22 cells (Fig. 4) and because glutathione peroxidase (GPx) represents a key enzyme involved in tBuOOH detoxification [58], we investigated the effects of RCS13 treatment on GPx activity, as well as on the expression of *Gpx1* and *Gpx4* genes and NPSH levels. RCS13 significantly increased the GPx activity ($p < 0.0001$, tenfold, Fig. 6a) in HT22 cells after 48 h of treatment in comparison to the control group. In addition, RCS13 treatment increased the transcript levels of *Gpx1* ($p < 0.001$, 4.4-fold, Fig. 6c) at 30 h after treatments in comparison to the control group, while transcripts of *Gpx4* were not upregulated by RCS13 treatments (Fig. 6d, e). No significant changes were observed in the levels of NPSH (Fig. 6b), whose composition consists of approximately 90% glutathione [59].

Mercaptosuccinic Acid (MS) Decreases the Protective Effect of RCS13 on HT22 Cells

Based on the aforementioned results (especially Fig. 4 and Fig. 6), we hypothesized that RCS13-induced protection against tBuOOH could be related, at least in part, to its stimulatory effects on GPx. To test this hypothesis, we

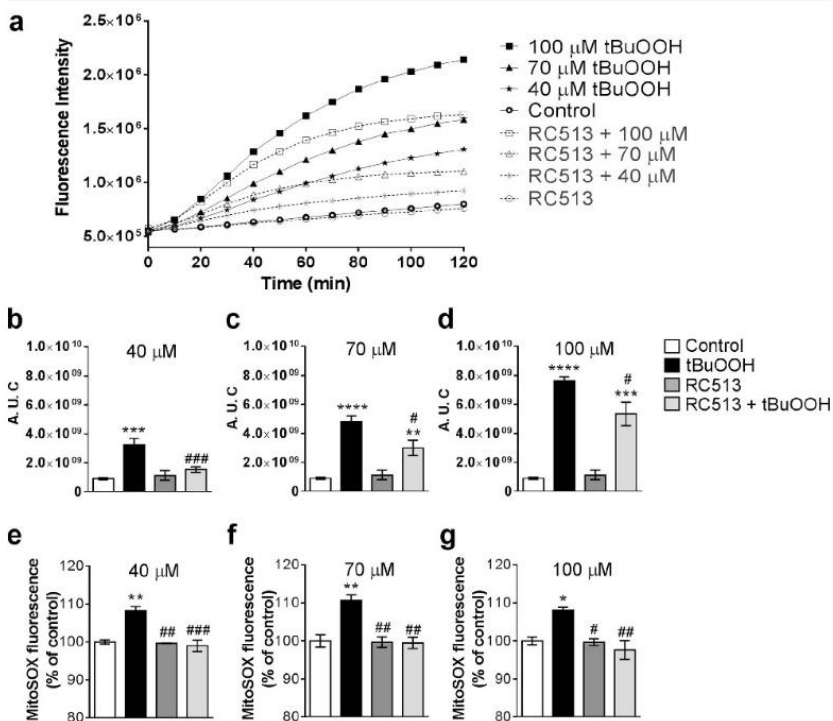


Fig. 4 Protective effects of RC513 against tBuOOH-induced RS generation. HT22 cells were treated with RC513 (2 μM) or vehicle (DMSO, 0.05%) for 48 h. (1) After incubation with 1 μM DCFH₂-DA for 30 min, cells were washed and exposed to tBuOOH (40, 70, or 100 μM) in HBSS. The fluorescence intensity (excitation at 490 nm and emission at 520 nm), which represents the oxidation of DCFH₂ by RS, was kinetically monitored for 2 h. **a** Representative time curve of the production of RS in HT22 cells treated with tBuOOH and vehicle followed by the exposure to different concentrations of tBuOOH (40–100 μM). **b–d** Oxidation rate of DCFH₂-DA. Area under the curve (AUC) calculated from the kinetics shown in **a**. RC513 decreased

RS generation induced by tBuOOH **b** 40 μM , **c** 70 μM , and **d** 100 μM . Data are represented as mean \pm SEM ($n=4-5$). (2) After incubation with 5 μM MitoSOX for 15 min, cells were washed and exposed to tBuOOH (40, 70, or 100 μM) in HBSS. The fluorescence intensity (excitation at 510 nm and emission at 580 nm) was recorded at 4 h. One asterisk, $p < 0.05$; two asterisks, $p < 0.01$; three asterisks, $p < 0.001$; and four asterisks, $p < 0.0001$ indicate the statistical differences compared to the control group (white bar), and three number signs, $p < 0.001$; two number signs, $p < 0.01$, and one number sign, $p < 0.05$, indicate the differences between tBuOOH and RC513 + tBuOOH groups. Two-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test was realized

investigated whether mercaptosuccinic acid (MS), an inhibitor of GPx activity, could mitigate the protective effect induced by RC513 in tBuOOH-exposed HT22 cells. As previously observed, RC513 induced a significant increase of GPx activity in HT22 cells and MS significantly decreased (approximately 80%) this effect (Fig. 7a). MS treatment, which did not affect cell viability per se, significantly decreased RC513-induced protection (Fig. 7b, c).

Discussion

Recent studies have reported the neuroprotective properties of probucol (PB) [10–13]. On the other hand, adverse effects have been described after the clinical use of PB in humans [15–17]. In this context, the search for new PB derivatives with less (or no) adverse effects could represent an interesting strategy to discover novel neuroprotective and safer

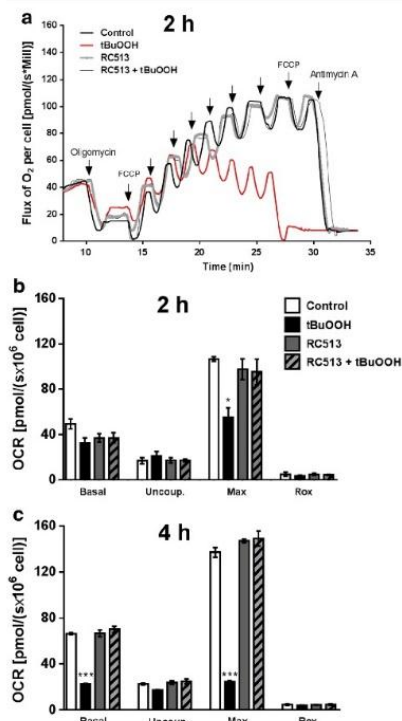


Fig. 5 Effects of RC513 on oxygen consumption rates (OCR) in HT22 cells. **a** Representative respirometry assay using HT22 cells exposed or not with tBuOOH (40 μ M) for 2 h in the culture medium. After OCR stabilization, the following electron transport system (ETS) modulators were added: oligomycin (1.25 μ M) to measure uncoupled OCR, sequential additions (0.5 μ M) of FCCP to achieve maximum OCR, and antimycin A (2.5 μ M) to determine residual OCR. **b** OCR records of HT22 cells in DMEM-5% FBS treated or not with tBuOOH for 2 h. The following conditions were assessed: basal OCR, after inhibition of ATP synthase with oligomycin (Uncoupled, uncoupled OCR), upon titration with FCCP (Max, maximum OCR), and after inhibition of respiratory complex III with antimycin A (Rox, residual respiration). **c** OCR records of HT22 cells in DMEM-5% FBS treated or not with tBuOOH for 4 h in similar conditions as in **b**. Data are represented as mean \pm SEM ($n = 3-4$). One asterisk, $p < 0.05$; three asterisks, $p < 0.001$; asterisks indicate the statistical differences compared to the control group (vehicle) that was not exposed to tBuOOH (white bar). Two-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test was realized

compounds. In the current study, the new organoselenium PB derivative, RC513, was synthesized followed by the

investigation of its effects against tBuOOH-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction, which represent two common events involved in the pathogenesis of the neurodegenerative diseases [60]. Our results showed that RC513 significantly protected neuronal HT22 cells against tBuOOH-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and decrease in cell viability. Of note, this protection was related to a significant increase in GPx activity and in the transcript levels of GPx1.

The pro-oxidant effects of tBuOOH have been extensively reported in the literature, especially in *in vitro* experimental models using cell cultures [39, 41]. In this regard, tBuOOH-induced RS generation and mitochondrial dysfunction have been reported to culminate in cell death [61–63]. Accordingly, our study showed that tBuOOH caused a rapid increase of DCF-monitored RS generation, followed by mitochondrial superoxide anion generation, mitochondrial dysfunction, and reduction of cell viability in HT22 neuronal lineage. In line with our results, *in vitro* studies also have described pro-oxidant effects of tBuOOH in neuronal cells, which have been responsible for the inhibition of axonal transport via peroxidation, with subsequent degenerative changes in organelles such as mitochondrial membrane, culminating in cell death [64–66].

The newly synthesized compound RC513 showed no evident cytotoxic effects on HT22 cells at the evaluated concentrations (1–10 μ M). Moreover, this compound (2 μ M) was able to protect HT22 cells from the effects caused by tBuOOH, including decreased cell viability (Fig. 3c, d) and RS overgeneration (Fig. 4). These results suggest that RC513-treated cells were more able to detoxify tBuOOH or, alternatively, tBuOOH-derived RS. Taking into account that (i) the observed protective effects were derived from an experimental protocol based on the pretreatment with this PB derivative and that (ii) the direct antioxidant (scavenger) effect of RC513 is significantly lower when compared to classic antioxidants, such as trolox (Supplemental Fig. S1), we hypothesized that the protection observed in this study likely involved the increase of endogenous antioxidant system(s) instead of a direct reaction between RC513 with tBuOOH (or derived RS). In line with this idea, beneficial effects of PB and its derivative (succinobucol) have been reported to be related to the increase of endogenous antioxidant defense systems [67, 68].

Mitochondria represent a main source of reactive species and, therefore, also represent a target of oxidative stress and its deleterious consequences [60, 69]. Considering the oxidative metabolic profile of neurons, aerobic oxidative phosphorylation (OXPHOS) is crucial for the proper attainment of metabolic energy in these cells. Thus, neurons die rapidly after inhibition of mitochondrial respiration compared to astrocytes, which are more competent in using anaerobic glycolytic pathway to obtain ATP [70]. In our study, a significant mitochondrial dysfunction of HT22 cells was observed at 2 h after

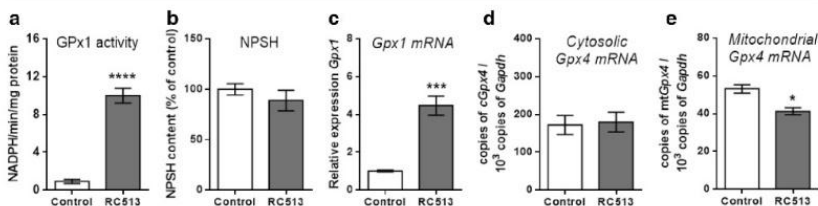


Fig. 6 Effect of RC513 on the GPx antioxidant defense system in HT22 cells. HT22 cells were treated with 2 μ M RC513 or vehicle for 48 h (a and b) or 30 h (c, d, and e). Cellular GPx activity (a) is expressed as nanomoles NADPH consumed per minute per milligram of protein. NPSH levels (b) are expressed as percent of control. Transcript levels of *Gpx1* (c) were normalized with the *Gapdh* gene and calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Copy numbers of transcripts of cytosolic (d) and

mitochondrial (e) *Gpx4* were calculated in relation to copy numbers of *Gapdh* using the standard curve of plasmids containing these genes. Values are represented as mean \pm SEM (a $n=6$; b $n=3$; c–f $n=4$). One asterisk, $p < 0.05$; three asterisks, $p < 0.001$; and four asterisks, $p < 0.0001$, indicate statistical difference from the control group (Student's *t* test)

exposure to 40 μ M tBuOOH (Fig. 5). Of note, no significant effects of 40 μ M tBuOOH were observed toward cell viability at this time point (2 h) (Fig. 2c, d), indicating that tBuOOH-induced loss of mitochondrial homeostasis preceded tBuOOH-induced decrease of cell viability. Giving support

to our results, Perron et al. [71] described cellular stress resulted from an early loss of mitochondrial reserve capacity in cultured 661W cells, without affecting basal respiration at 30 min after (50 μ M) tBuOOH exposure, with subsequent cell death at 24 h. In this regard, some lines of evidence indicate

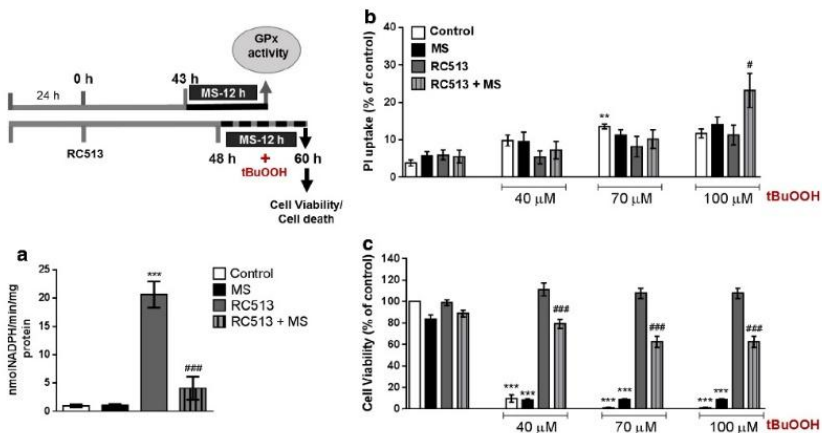
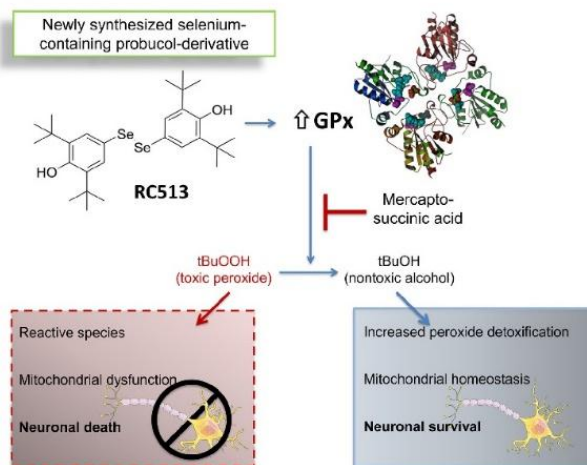


Fig. 7 Glutathione peroxidase inhibition decreases RC513-induced protection in HT22 cells exposed to tBuOOH. **a** HT22 cells were treated with RC513 (2 μ M) or vehicle for 43 h followed by incubation with mercaptosuccinic acid (MS) (5 nM, GPx inhibitor) for ~12 h, and GPx activity was evaluated. Results are shown as mean \pm SEM. Three asterisks, $p < 0.001$, indicate statistical difference from the control (vehicle) and three number signs, $p < 0.001$, indicate statistical difference between RC513 and RC513 + MS groups by two-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test. **b** HT22 cells were treated with RC513 or vehicle for 48 h and exposed to tBuOOH (40, 70, and 100 μ M) for 12 h, in the presence or absence of MS (5 mM). Then, viability assays [PI uptake

(b) and MTT reduction (c)] were performed. Results of the MTT test are expressed as the percentage of MTT reduction with respect to control values. Results of the IP test are expressed as percent of IP uptake, where the 100% of cell death value represents control cells treated with 2% Triton X-100 for 15 min. Results are shown as mean \pm SEM. Two asterisks, $p < 0.01$, and three asterisks, $p < 0.001$, indicate statistical difference from the control (vehicle) not exposed to tBuOOH, and one number sign, $p < 0.05$, and two number signs, $p < 0.001$, indicate statistical difference between RC513 and RC513 + MS both exposed to tBuOOH. Two-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test was realized

Fig. 8 Representative scheme of the protective effect of RC513 through GPx upregulation against tBuOOH-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in HT22 neuronal cells



that drugs that improve mitochondrial functions (or chemoprevent mitochondrial dysfunction) represent a promising strategy to counteract the deleterious effects of RS [72]. In our study, RC513 protected against tBuOOH-induced RS generation and mitochondrial dysfunction and, accordingly, protected against tBuOOH-induced decrease of cell viability and cell death. Moreover, RC513 prevented peroxide-induced mitochondrial superoxide anion generation at different tBuOOH concentrations (40, 70, and 100 μM) (Fig. 4e–g), reinforcing the idea that RC513-induced protection involved the maintenance of proper mitochondrial function in HT22 cells. Based on these results, it is possible to state that the observed RC513-mediated mitoprotective effects were responsible for the maintenance of cell survival in tBuOOH-exposed cells.

As previously mentioned, our results concerning RC513-mediated inhibition of RS overproduction (Fig. 4) and maintenance of mitochondrial homeostasis (Fig. 5) in tBuOOH-treated cells suggest that RC513-mediated cytoprotection was related with increased RS detoxification. Taking into account that peroxides are classically detoxified by peroxidases and that glutathione peroxidases represent a major family of proteins involved in peroxide detoxification [73, 74], we investigated whether RC513 would be able to modulate this antioxidant system, with a specific focus on the two major glutathione peroxidase isoenzymes (*Gpx1* and *Gpx4*). RC513 significantly increased the expression levels of *Gpx1*, and this result correlated with increased GPx activity in HT22 cells. Despite the statistical significance ($p < 0.05$) regarding

the decrease of *Gpx4* expression, it is reasonable to suppose that the observed changes in the expression of this gene (1.3-fold change) do not represent a biologically relevant event. This idea is based on the functional thresholds used in quantitative PCR analyses [75], which establishes a minimum change in target gene expression (1.5-fold) necessary to be considered as a biologically significant response to treatment (regardless of statistical significance). To evaluate the importance of GPx activity in the protection induced by RC513 in HT22 cells, we performed experiments using mercaptosuccinic acid (MS), an inhibitor of GPx [76, 77]. The results showed that GPx activity was significantly inhibited (approximately 80%) after MS treatment (Fig. 7a), but MS alone did not decrease cell viability in cells not exposed to tBuOOH (Fig. 7c). However, the protective effects of RC513 against tBuOOH-induced decrease of cell viability were significantly decreased in MS-treated cells, indicating that the observed increase of GPx activity in RC513-treated cells represents a key phenomenon related to the protection elicited by this new PB derivative. Despite the observed modulation of GPx activity after RC513 treatment, it is important to mention that pharmacological effects of some organoselenium compounds might be explained by their ability to oxidize the thiol groups of proteins and to spare selenoproteins from inactivation by soft-electrophiles [28]. Moreover, some organoselenium compounds also display protective effects via induction of peroxiredoxins [29] and activation of Nrf2 [30], which regulates genes involved in the cellular antioxidant responses. Therefore, we do not

disregard the participation of mechanisms other than the upregulation of GPx activity in the protection of RC513 in HT22 cells, which deserve to be studied later. However, in this study, we emphasize the importance of the enzyme GPx in this protection. Indeed, we also evaluated the expression of *Tr2* (thioredoxin reductase 2) gene, which encoded a selenium-dependent mitochondrial protein, and no differences were found in its expression at different times (3, 6, 12, and 24 h) after the treatment of HT22 cells with RC513 in comparison to untreated HT22 cells (Supplemental Table S1).

Even though our results indicate that increased GPx activity is a main event related to the protection elicited by RC513 in HT22 cells, molecular mechanisms mediating this increase are not yet understood. Although PB derivatives (i.e., succinobucol) have been reported to increase antioxidant activity through the activation of transcription factors, such as Nrf2 [68], additional mechanisms could be hypothesized for RC513. In this regard, the use of inorganic selenium (after RC513 metabolism) for the synthesis of selenoproteins (i.e., GPx) cannot be ruled out. The metabolic scission of the carbon-selenium bond in organic diselenides has been reported [78], and simple organoselenium compounds (including diselenides) can furnish selenium to the inorganic pool of selenium [79]. In this scenario, it seems that the inorganic selenide released from aromatic and aliphatic selenides can be used in the synthesis of selenoproteins (for a review, see Rocha et al. [80]). Thus, the stimulatory effect of RC513 (an organic diselenide) toward GPx activity could be related, at least in part, to the increased availability of inorganic selenium (after RC513 metabolism), which can be used for the synthesis of this selenoprotein. In this scenario, one may expect that *Gpx1* isoenzyme would be preferentially synthesized compared to *Gpx4* because the first presented a greater amount of transcripts in RC513-treated HT22 cells.

Although both GPx1 and GPx4 can detoxify tBuOOH, various authors reported that tBuOOH is a better substrate for GPx1 enzyme in comparison to GPx4 [73, 81–83], which can explain the necessity of considerably higher concentrations of tBuOOH to kill cells expressing a high level of GPx1 [83]. These data help to explain our results in relation to the protection observed at high tBuOOH concentrations in HT22 cells treated with RC513, which may be in large part related to an increase of GPx1. Moreover, we can hypothesize that the RC513 compound would activate GPx1-specific transcription factors not related to GPx4.

In conclusion, we describe the synthesis of a novel selenium-containing PB derivative (RC513), as well as its protective effects in an experimental model of mitochondrial damage induced by tBuOOH treatment in the HT22 neuronal cell line. The results showed a significant protective effect of RC513 against tBuOOH-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction, which was related to the upregulation of GPx, a key protein mediating peroxide detoxification

(Fig. 8). The marked increase in the levels of GPx1 transcripts observed in our study represents a significant novelty because no similar action mechanisms have been previously reported for this class of compounds. Our results indicate that this new PB derivative represents a promising neuroprotective molecule. However, further studies concerning potential beneficial effects and safety aspects of RC513 under *in vivo* conditions are well warranted.

Acknowledgements The financial support by (i) Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC), (ii) Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and (iii) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) is gratefully acknowledged. MF, AFB, and ALB are CNPq fellowship recipients. Part of the work was performed with the support from LAMEB (Laboratório Multiusuário de Ciências Biológicas—UFSC), whose technicians are gratefully acknowledged. The authors are also thankful to CEBIME-UFSC for mass analyses.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Sies H, Jones D (2007) Oxidative stress. *Encycl Stress*:45–48
- Sies H (2015) Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol* 4:180–183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
- Bozzo F, Mirra A, Carri MT (2017) Oxidative stress and mitochondrial damage in the pathogenesis of ALS: new perspectives. *Neurosci Lett* 636:3–8. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.04.065>
- Ganguly G, Chakrabarti S, Chatterjee U, Saso L (2017) Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: cross talk in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Drug Des Devel Ther* 11:797–810. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S130514>
- Liu Z, Zhou T, Ziegler AC et al (2017) Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from molecular mechanisms to clinical applications. *Oxidative Med Cell Longev* 2017:1–11
- Jim H, Kanthasamy A, Ghosh A, Anantharam V, Kalyanaraman B, Kanthasamy AG (2014) Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of Parkinson's disease: preclinical and clinical outcomes. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1842(8):1282–1294. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2013.09.007>
- Sandhir R, Yadav A, Sunkaria A, Singhal N (2015) Nano-antioxidants: an emerging strategy for intervention against neurodegenerative conditions. *Neurochem Int* 89:209–226. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.08.011>
- Ruan Q, Ruan J, Zhang W, Qian F, Yu Z (2017) Targeting NAD⁺ degradation: the therapeutic potential of flavonoids for Alzheimer's disease and cognitive frailty. *Pharmacol Res*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.08.010>
- Yamashita S, Hbujo H, Arai H et al (2008) Long-term probucol treatment prevents secondary cardiovascular events: a cohort study of patients with heterozygous familial hypercholesterolemia in Japan. *J Atheroscler Thromb* 15(6):292–303. <https://doi.org/10.5551/jat.E610>

10. Santos DB, Peres KC, Ribeiro RP, Colle D, Santos AA, Moreira ELG, Souza DOG, Figueiredo CP et al (2012) Probucol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid β peptide in mice. *Exp Neurol* 233(2):767–775. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.11.036>
11. Colle D, Santos DB, Moreira ELG et al (2013) Probucol increases striatal glutathione peroxidase activity and protects against 3-nitropropionic acid-induced pro-oxidative damage in rats. *PLoS One* 8:1–15
12. Ribeiro RP, Moreira ELG, Santos DB, Colle D, dos Santos AA, Peres KC, Figueiredo CP, Farina M (2013) Probucol affords neuroprotection in a 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease. *Neurochem Res* 38(3):660–668. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0965-0>
13. Farina M, Campos F, Vendrell I, Berenguer J, Barzi M, Pons S, Suñol C (2009) Probucol increases glutathione peroxidase-1 activity and displays long-lasting protection against methylmercury toxicity in cerebellar granule cells. *Toxicol Sci* 112(2):416–426. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp219>
14. Colle D, Santos DB, Hartwig JM, Godoi M, Braga AL, Farina M (2013) Mitochondrion succinobucol versus probucol: higher efficiency of succinobucol in mitigating 3-NP-induced brain mitochondrial dysfunction and oxidative stress *in vitro*. *Mitochondrion* 13(2): 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.01.005>
15. Tardif J-C, Grégoire J, L'Allier PL (2002) Prevention of restenosis with antioxidants: mechanisms and implications. *Am J Cardiovasc Drugs* 2(5):323–334. <https://doi.org/10.2165/00129784-200202050-00005>
16. McDowell I, Brennan G, McEneny J et al (1994) The effect of probucol and vitamin E treatment on the oxidation of low-density lipoprotein and forearm vascular responses in humans. *Eur J Clin Invest* 24(11):759–765. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1994.tb01073.x>
17. Tardif JC, Grégoire J, Schwartz L, Title L, Laramée L, Reeves F, Lespérance J, Bourassa MG et al (2003) Effects of AGI-1067 and probucol after percutaneous coronary interventions. *Circulation* 107(4):552–558. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000047525.58618.3C>
18. Stocker R (2009) Molecular mechanisms underlying the antiatherosclerotic and antidiabetic effects of probucol, succinobucol, and other probucol analogues. *Curr Opin Lipidol* 20(3):227–235. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e32832ae68>
19. Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT (2004) Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 104(12):6255–6285. <https://doi.org/10.1021/cr0406559>
20. Posser T, Franco JL, dos Santos DA, Rigon AP, Farina M, Dafre AL, Teixeira Rocha JB, Leal RB (2008) Diphenyl diselenide confers neuroprotection against hydrogen peroxide toxicity in hippocampal slices. *Brain Res* 1199:138–147. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.01.004>
21. Dobnackinski F, da Silva MH, Tassi CLC, de Carvalho NR, Dias GRM, Golombieski RM, da Silva Loreto EL, da Rocha JBT et al (2014) Neuroprotective effect of diphenyl diselenide in an experimental stroke model: maintenance of redox system in mitochondria of brain regions. *Neurotox Res* 26(4):317–330. <https://doi.org/10.1007/s12640-014-9463-2>
22. Rosa RM, Flores DG, Appelt HR, Braga AL, Henriques JAP, Roessler R (2003) Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. *Neurosci Lett* 341(3):217–220. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(03\)00187-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(03)00187-3)
23. Stangherlin EC, Luchese C, Pinton S, Rocha JBT, Nogueira CW (2008) Sub-chronical exposure to diphenyl diselenide enhances acquisition and retention of spatial memory in rats. *Brain Res* 1201: 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.01.061>
24. Pinton S, da Rocha JT, Zeni G, Nogueira CW (2010) Organoselenium improves memory decline in mice: involvement of acetylcholinesterase activity. *Neurosci Lett* 472(1):56–60. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.01.057>
25. Pinton S, Trevisan J, Gai BM, Prigol M (2011) Neurosporadic effect of p,p'-methylxylyl-diphenyl diselenide in a model of sporadic dementia of Alzheimer's type in mice: contribution of antioxidant mechanism. *Cell Biochem Funct* 29(3):235–243. <https://doi.org/10.1002/cbf.1741>
26. Pinton S, Souza AC, Sari MHM, Ramalho RM, Rodrigues CMP, Nogueira CW (2013) Pp'-Methoxylyl-diphenyl diselenide protects against amyloid- β induced cytotoxicity *in vitro* and improves memory deficits *in vivo*. *Behav Brain Res* 247:241–247. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.03.034>
27. Pinton S, Brúning CA, Sartori Oliveira CE, Prigol M, Nogueira CW (2013) Therapeutic effect of organoselenium dietary supplementation in a sporadic dementia of Alzheimer's type model in rats. *J Nutr Biochem* 24(1):311–317. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.06.012>
28. Barbosa NV, Nogueira CW, Noga PA, de Bem AF, Aschner M, Rocha JBT (2017) Organoselenium compounds as mimics of selenoproteins and thiol modifier agents. *Metallomics* 9(12): 1703–1734. <https://doi.org/10.1039/c7mt00083a>
29. Fiúza B, Subelzú N, Calcerada P, Straliozzo MR, Piacenza L, Cassina A, Rocha JBT, Radi R et al (2015) Impact of SIN-1-derived peroxynitrite flux on endothelial cell redox homeostasis and bioenergetics: protective role of diphenyl diselenide via induction of peroxiredoxins. *Free Radic Res* 49(2):122–132. <https://doi.org/10.3109/10715762.2014.983096>
30. de Bem AF, Fiúza B, Calcerada P et al (2013) Protective effect of diphenyl diselenide against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: a comparison with ebselen. *Nitric Oxide* 31:20–30
31. Davis JB, Maher P (1994) Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Res* 652(1):169–173. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90334-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90334-4)
32. Liu J, Li L, Suo WZ (2009) HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. *Life Sci* 84(9–10):267–271. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2008.12.008>
33. Poteet E, Winters A, Yan LJ, Shufelt K, Green KN, Simpkins JW, Wen Y, Yang SH (2012) Neuroprotective actions of methylene blue and its derivatives. *PLoS One* 7(10):e48279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048279>
34. Jirásek P, Amslinger S, Heilmann J (2014) Synthesis of natural and non-natural curcuminoids and their neuroprotective activity against glutamate-induced oxidative stress in HT-22 cells. *J Nat Prod* 77(10):2206–2217. <https://doi.org/10.1021/mp500396y>
35. Lee DS, Cha BY, Woo JT, Kim YC, Jang JH (2015) Acerogenin A from *Acer nikoense* maxim prevents oxidative stress-induced neuronal cell death through Nrf2-mediated heme oxygenase-1 expression in mouse hippocampal HT22 cell line. *Molecules* 20(7): 12545–12557. <https://doi.org/10.3390/molecules200712545>
36. Tobaben S, Grohm J, Seiler A, Conrad M, Plesnila N, Culnase C (2011) 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 Differ* 18(2): 282–292. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.92>
37. Kumari S, Mehta SL, Li PA (2012) Glutamate induces mitochondrial dynamic imbalance and autophagy activation: preventive effects of selenium. *PLoS One* 7(6):e39382. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039382>
38. Salvi A, Parki G, Khan E, Asghar M, Salim S (2016) Protective effect of tempol on hippocampal sulfoximine-induced mitochondrial impairment in hippocampal derived HT22 cells. *Oxidative Med Cell Longev* 2016:1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/5059043>
39. Amoroso S, Gioielli A, Cataldi M, di Renzo G, Annunziato L (1999) In the neuronal cell line SH-SY5Y, oxidative stress-

- induced free radical overproduction causes cell death without any participation of intracellular Ca^{2+} increase. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1452(2):151–160. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(99\)00110-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(99)00110-X)
40. Bae SJ, Lee JS, Kim JM, Lee EK, Han YK, Kim HJ, Choi J, Ha YM et al (2010) 5-Hydroxytryptophan inhibits tert-butylhydroperoxide (t-BHP)-induced oxidative damage via the suppression of reactive species (RS) and nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) activation on human fibroblast. *J Agric Food Chem* 58(10):6387–6394. <https://doi.org/10.1021/jf904201h>
 41. Kučera O, Endlicher R, Roušar T, Lotková H, Gamol T, Drahotka Z, Červinková Z (2014) The effect of tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress on lean and stoeatic rat hepatocytes *in vitro*. *Oxidative Med Cell Longev* 2014:1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/752506>
 42. Kang T-H, Baek H-Y, Kim Y-C (2005) Protective effect of jakyakkamcho-tang extract and its constituents against t-BHP-induced oxidative damage in HT22 cells. *Am J Chin Med* 33(02):181–189. <https://doi.org/10.1142/S0192415X05002850>
 43. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2):55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
 44. Riccardi C, Nicoletti I (2006) Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 1(3):1458–1461. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.238>
 45. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci Technol* 28(1):25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
 46. Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77:325–333. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77046-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77046-0)
 47. Pance J, Stoytcheva ZR, Liu W, Berry MJ (2007) Selenoprotein H is a redox-sensing high mobility group family DNA-binding protein that up-regulates genes involved in glutathione synthesis and phase II detoxification. *J Biol Chem* 282(33):23759–23765. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702267200>
 48. Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82(1):70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
 49. Casañas-Sánchez V, Pérez JA, Fabelo N, Herrera-Herrera AV, Fernández C, Marín R, González-Montelongo MC, Díaz M (2014) Addition of docosahexaenoic acid, but not arachidonic acid, activates glutathione and thioredoxin in antioxidant systems in murine hippocampal HT22 cells: potential implications in neuroprotection. *J Neurochem* 131(4):470–483. <https://doi.org/10.1111/jnc.12833>
 50. Kwon MS, Woo SK, Kurland DB, Yoon S, Palmer A, Banerjee U, Iqbal S, Ivanova S et al (2015) Methemoglobin is an endogenous Toll-like receptor 4 ligand-relevance to subarachnoid hemorrhage. *Int J Mol Sci* 16(3):5028–5046. <https://doi.org/10.3390/ijms16035028>
 51. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method. *Biochem Biophys Res Commun* 282(4):402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
 52. Borchert A, Chi CW, Ufer C et al (2006) The role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase isoforms in murine embryogenesis. *J Biol Chem* 281(28):19655–19664. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601195200>
 53. Bansal Y, Silakari O (2014) Multifunctional compounds: smart molecules for multifactorial diseases. *Eur J Med Chem* 76:31–42. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.01.060>
 54. Dias KST, Viegas C Jr (2014) Multi-target directed drugs: a modern approach for design of new drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol* 12(3):239–255. <https://doi.org/10.2174/1570159X1203140511153200>
 55. Kachanov AV, Slabko OY, Baranova OV, Shilova EV, Kaminski VA (2004) Triselenium dicyanide from malononitrile and selenium dioxide. One-pot synthesis of selenocyanates. *Tetrahedron Lett* 45(23):4461–4463. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.04.071>
 56. Krief A, Delmotte C, Dumont W (1997) Chemosselective reduction of organoselenocyanates to diselenides. *Tetrahedron Lett* 38(17):3079–3080. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(97\)00549-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(97)00549-2)
 57. Taffess BG, Takahashin N, Kenslers W, Mason RP (1987) Generation of free radicals from organic hydroperoxide tumor promoters in isolated mouse keratinocytes. *J Biol Chem* 262:12143–12149
 58. Toppo S, Flohé L, Ursini F, Vanin S, Maiorino M (2009) Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1790(11):1486–1500. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.04.007>
 59. DeLucia AJ, Mustafa MG, Hussain MZ, Cross CE (1975) Ozone interaction with rodent lung. III. Oxidation of reduced glutathione and formation of mixed disulfides between protein and nonprotein sulfhydryls. *J Clin Invest* 55(4):794–802. <https://doi.org/10.1172/JCI107990>
 60. Lin MT, Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443(7113):787–795. <https://doi.org/10.1038/nature05292>
 61. Haidara K, Morel I, Abalca V, Gascon Barré M, Denizeau F (2002) Mechanism of tert-butylhydroperoxide induced apoptosis in rat hepatocytes: involvement of mitochondria and endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1542(1-3):173–185. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(01\)00178-1](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(01)00178-1)
 62. Piret JP, Amoult T, Fuks B, Chatelein P, Remaecq J, Michiels C (2004) Mitochondria permeability transition-dependent tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis in hepatoma HepG2 cells. *Biochem Pharmacol* 67(4):611–620. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.09.026>
 63. Lv H, Liu Q, Zhou J, Tan G, Deng X, Ci X (2017) Daphnetin-mediated Nrf2 antioxidant signaling pathways ameliorate tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)-induced mitochondrial dysfunction and cell death. *Free Radic Biol Med* 106:38–52. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.016>
 64. Sonee M, Martens JR, Evers MR, Mukherjee SK (2003) The effect of tertiary butylhydroperoxide and nicotinamide on human cortical neurons. *Neurotoxicology* 24(3):443–448. [https://doi.org/10.1016/S0161-813X\(03\)00019-6](https://doi.org/10.1016/S0161-813X(03)00019-6)
 65. Isonaka R, Hiruma H, Kawakami T (2011) Inhibition of axonal transport caused by tert-butyl hydroperoxide in cultured mouse dorsal root ganglion neurons. *J Mol Neurosci* 45(2):194–201. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9457-3>
 66. Hajieva P, Bayatti N, Granold M, Behl C, Moosmann B (2015) Membrane protein oxidation determines neuronal degeneration. *J Neurochem* 133(3):352–367. <https://doi.org/10.1111/jnc.12987>
 67. Santos DB, Colle D, Moreira ELG, Peres KC, Ribeiro RP, dos Santos AA, de Oliveira J, Hort MA et al (2015) Probulmit mitigates streptozotocin-induced cognitive and biochemical changes in mice. *Neuroscience* 284:590–600. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.10.019>
 68. Colle D, Santos DB, Hartwig JM, Godoi M, Engel DF, de Bem AF, Braga AL, Farina M (2016) Sucinobucol, 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. *Mol Neurobiol* 53(2):1280–1295. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9086-x>
 69. Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417(1):1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>

70. Bolaños JP, Almeida A, Moncada S (2010) Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends Biochem Sci* 35(3):145–149. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.10.006>
71. Perron NR, Beeson C, Rohrer B (2013) Early alterations in mitochondrial reserve capacity: a means to predict subsequent photoreceptor cell death. *J Bioenerg Biomembr* 45(1–2):101–109. <https://doi.org/10.1007/s10863-012-9477-5>
72. Lyakhovich A, Graifer D (2015) Mitochondria-mediated oxidative stress: old target for new drugs. *Curr Med Chem* 22(26):3040–3053. <https://doi.org/10.2174/0929867322666150729114036>
73. Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohé R et al (1995) Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 252:38–53
74. Brigelius-Flohé R, Maiorino M (2013) Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 1830(5):3289–3303. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>
75. Edmunds RC, McIntyre JK, Adam Luckenbach J et al (2014) Toward enhanced MIQE compliance: reference residual normalization of qPCR gene expression data. *J Biomol Tech* 25(2):54–60. <https://doi.org/10.7171/jbt.14-2502-003>
76. Chaudiere J, Wilhelmens EC, Tappel AL (1984) Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acids and other mercaptans. *J Biol Chem* 259(2):1043–1050
77. Dunning S, ur Rehman A, Tiebosch MH, Hannivoort RA, Haijer FW, Woudenberg J, van den Heuvel FAJ, Buist-Homan M et al (2013) Glutathione and antioxidant enzymes serve complementary roles in protecting activated hepatic stellate cells against hydrogen peroxide-induced cell death. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1832(12):2027–2034. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2013.07.008>
78. Adams WJJ, Kocsis JJ, Snyder R (1989) Acute toxicity and urinary excretion of diphenylselenide. *Toxicol Lett* 48(3):301–310. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(89\)90057-X](https://doi.org/10.1016/0378-4274(89)90057-X)
79. Schwarz K, Foltz C (1958) Factor 3 activity of selenium compounds. *J Biol Chem* 233(1):245–251
80. Rocha JBT, Piccoli BC, Oliveira CS (2017) Biological and chemical interest in selenium: a brief historical account. *ARKIVOC*:457–491
81. Grossmann A, Wendel A (1983) Non-reactivity of the selenoenzyme glutathione peroxidase with enzymatically hydroperoxidized phospholipids. *Eur J Biochem* 135(3):549–552. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07687.x>
82. Maiorino M, Gregolin C, Ursini FBT-M in E (1990) [47] Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. In: Sies H, Glazer A (eds) Oxygen radicals in biological systems part B: oxygen radicals and antioxidants, 1st edition. Academic Press, pp 448–457
83. Kriska T, Levchenko VV, Chu FF, Esworthy RS, Girotti AW (2008) Novel enrichment of tumor cell transfectants expressing high levels of type 4 glutathione peroxidase using 7 α -hydroperoxycholesterol as a selection agent. *Free Radic Biol Med* 45(5):700–707. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.022>

ANEXO II: Manuscrito para ser submetido na revista Redox Biology

Diphenyl diselenide protects neuronal cells against oxidative stress and mitochondrial dysfunction: involvement of the glutathione-dependent antioxidant system

Ruth Liliám Quispe^a, Michael Lorenz Jaramillo^b, Leticia Galan Selinger^c, Alcir Luiz Dafre^a, João Batista Teixeira da Rocha^d, Rafael Radi^e, Marcelo Farina^a, Andreza Fabro de Bem^{a,f*}

^a Neuroscience PhD Program, Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

^b Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, SC, Brazil.

^c Biochemistry PhD Program, Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

^d Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^e Department of Biochemistry and Center for Free Radical and Biomedical Research (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

^f Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil.

*Corresponding authors:

Andreza Fabro de Bem (andreza.bem@ufsc.br) and Marcelo Farina (marcelo.farina@ufsc.br). Department of Biochemistry, Center for Biological Sciences, Campus Universitário, Trindade, Federal University of Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. Phone: +55 4837219589.

Abstract

Oxidative stress and mitochondrial dysfunction are critical events mediating the physiopathogenesis of neurodegenerative diseases; therefore, molecules that increase cellular antioxidant defenses represent promising strategies to counteract such conditions. The aim of this study was to investigate the potential protective effect of (PhSe)₂ on mouse hippocampal cell line (HT22) exposed to tBuOOH (*in vitro* model of oxidative stress), as well as to elucidate potential mechanisms underlying this protection. Our results showed that tBuOOH caused time- and concentration-dependent cytotoxicity, which was preceded by increased oxidants production and mitochondrial dysfunction. (PhSe)₂ pretreatment significantly prevented these cytotoxic events and the observed protective effects were paralleled by the upregulation of the cellular glutathione-dependent antioxidant system: (PhSe)₂ increased GSH levels (>60%), GPx activity (6.9-fold) and the mRNA expression of antioxidant enzymes *Gpx1* (3.9-fold) and *Gclc* (2.3-fold). Of note, the cytoprotective effect of (PhSe)₂ was significantly decreased when cells were treated with mercaptosuccinic acid, an inhibitor of GPx, indicating the involvement of GPx modulation in the observed protective effect. In summary, the present findings bring out a new action mechanism concerning the antioxidant properties of (PhSe)₂. The observed upregulation of the glutathione-dependent antioxidant system represents a future pharmacologic possibility that goes beyond the well-known thiol-peroxidase activity of this compound.

Keyword: Diphenyl diselenide, Glutathione peroxidase, mitochondrial dysfunction, oxidative stress, antioxidant, HT22 cells, tBuOOH.

Highlights

- (PhSe)₂ protects HT22 cells against cell death induced by tBuOOH.
- (PhSe)₂ prevents the oxidative stress and mitochondrial dysfunction induced by tBuOOH.
- (PhSe)₂ increases GPx activity and GSH levels in HT22 cells.
- The modulation of GPx is involved in the protective effect of (PhSe)₂.

1. Introduction

Neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis, differ widely in their pathology and symptoms. However, they share common events that can mediate the neurodegeneration observed in these conditions. Because neurons are highly demanding energy cells that rely on the mitochondrial integrity to support this bioenergetic demand [1], mitochondrial dyshomeostasis represent one of the mentioned common events mediating the neuronal damage characteristic of different neurodegenerative diseases [2].

The brain is particularly vulnerable to oxidative stress because of its high metabolic rate and relatively low antioxidant defense capability [3]. Because the brain is rich in lipids containing polyunsaturated fatty acids (PUFAs), lipid peroxidation is the prominent type of oxidative damage [4]. In this context, glutathione peroxidases (GPxs), which catalyze the reduction of H₂O₂ or organic hydroperoxides to water or the corresponding alcohols, respectively, typically

using glutathione (GSH) as reductant, play a critical role in the control of oxidative stress in the brain [5]. Particularly, GPx1, which is present in both neurons and glial cells [6], is ubiquitously found in the cytosol and mitochondria of cells, working in the water phase. GPx4 is a plasma and mitochondria membrane associated enzyme, where it catalyzes the reduction of lipid hydroperoxides [5,7]. Moreover, overexpression of GPx decreases neuronal cell death and reduces hydrogen peroxide accumulation and the consequent lipid peroxidation under neurotoxic conditions [8].

Taking into account the aforementioned, strategies to counteract harmful cellular oxidative events and preserve mitochondrial integrity by increasing cellular antioxidant defenses are emerging as a promising therapeutic approaches to prevent neuronal damage. In this scenario, various organoselenium compounds have been synthesized and studied over the years aiming to mimic the peroxidase activity of the GPx, however the biological properties of organoselenium compounds are much more complex and seem to go far beyond their GPx mimetic activity [9]. Of particular importance, our group and others are dedicated to evaluating the antioxidant properties of the simple diaryldiselenide, diphenyl diselenide (PhSe)₂. Pharmacological properties of (PhSe)₂ has been described in experimental models of central nervous system (CNS) pathologies, including Parkinson's disease [10], Alzheimer's disease [11], methylmercury-induced neurotoxicity [12], and as antidepressive therapy [13]. Some *in vitro* studies were performed to evaluate the mechanisms involved in the cytoprotective effect of (PhSe)₂ against different oxidative stress conditions. (PhSe)₂ prevented the endothelial and mitochondrial dysfunction induced by peroxynitrite through enhancing cellular antioxidant defenses [14,15]. Moreover, this simple organoselenium compound protected macrophages, against the oxLDL cytotoxic effects by reducing the oxidants production, which in turn prevented the nuclear factor NF-κB activation [16].

As already mentioned, specific organoselenium compounds have been synthesized to mimic the peroxidase activity of the GPx and therefore protect against oxidative stress-related conditions [17]. However, the simple thiolperoxidase activity of these compounds seem to be not enough to justify their antioxidant properties in biological systems [17,18]. In this study, we aimed to evaluate the beneficial effects of (PhSe)₂ against oxidative changes promoted by tBuOOH in the HT22 neuronal cell line. The hippocampal neuronal cell line HT22 has been used to unravel mechanistic aspects associated with hippocampal damage and potential therapeutic strategies in neurodegenerative diseases [19] while *tert*-Butyl hydroperoxide (tBuOOH) has been widely used to induce oxidative stress and mitochondrial dysfunction in a variety of cell types including HT22 cell [20]. Our data indicate that (PhSe)₂ was effective in preventing tBuOOH-induced oxidants production and mitochondrial dysfunction by modulating the glutathione-dependent antioxidant system, particularly the GPx1.

2. Results

2.1. tBuOOH induces toxicity in HT22 cells

The effect of tBuOOH exposure in HT22 cell viability was evaluated in time- and concentration-response experiments. The Figure 1A and 1B depict concentration-response studies after overnight exposure (~12 h) of HT22 cells to

tBuOOH (0-100 μM). The results show that tBuOOH caused a significant decline in the MTT reduction starting at 20 μM (Fig. 1A). In addition, tBuOOH induced a disruption in cell plasma membrane (PI uptake) starting at 40 μM (Fig. 1B). Therefore, the 40 μM tBuOOH concentration was used in the time-response study (2 to 12 h). At this condition, the cells present a significant reduction in the ability to convert MTT to formazan starting 6 h after exposures (Fig. 1C) and a significant disruption of the cellular plasma membrane was verified after 9 h (increased PI uptake) (Fig. 1D). Based on these results, it can be argued that cell viability and cell plasma membrane integrity were not significantly affected within two or four hours of exposure to tBuOOH (40 μM). Thus, these conditions were chosen to investigate molecular mechanisms mediating the toxicity induced by tBuOOH, as well as the potential protective effects of (PhSe)₂.

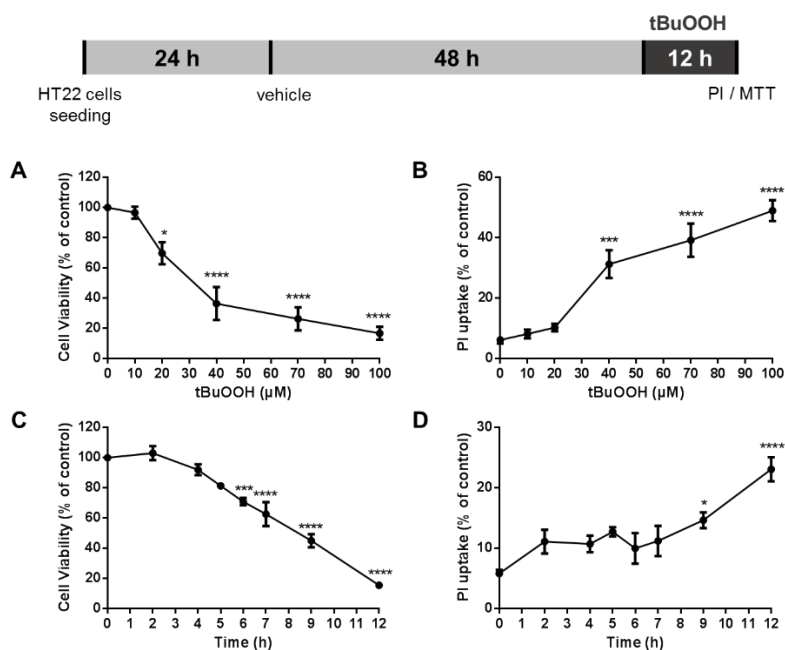


Fig. 1. tBuOOH induced toxicity in HT22 cells. HT22 cells were exposed to different tBuOOH concentrations (10–100 μM) for ~12 h (A, B) or to 40 μM for 2 to 12 h (C, D). Cell viability was evaluated by MTT reduction (A, C) and PI uptake (B, D). Results of MTT assay were expressed as the percentage of MTT reduction with respect to control group. Results of PI assays were expressed as the percent of PI uptake-cell, where the 100% of cell death value represents cells treated with 2 % Triton X-100 during 15 min. Data were represented as mean \pm SEM (A,B; n=6) (C, D; n=4). * p <0.05, *** p <0.001 and **** p <0.0001 indicate statistical difference from control group by one-way ANOVA, followed by the Tukey *post hoc* test.

2.2. (PhSe)₂ protects HT22 cells against tBuOOH-mediated toxicity

Firstly, to assess non-toxic concentrations of (PhSe)₂, a concentration-response study was conducted by treating HT22 cells for 48 h with concentrations of (PhSe)₂ ranging from 0.5 to 10 μM. As shown in Fig. 2A-B, there was no significant decrease in cell viability after 48 h of treatment with (PhSe)₂ at concentrations up to 6 μM. Based on these results, the non-toxic concentrations of (PhSe)₂ (1 - 5 μM) were chosen to evaluate its protective effect against tBuOOH-mediated cytotoxicity (Fig. 2A-B). Our results show that the treatment with 2 μM of (PhSe)₂ for 48 h significantly protected HT22 cells against tBuOOH-induced decrease in MTT reduction (Fig. 2C) and increase PI uptake (Fig. 2D).

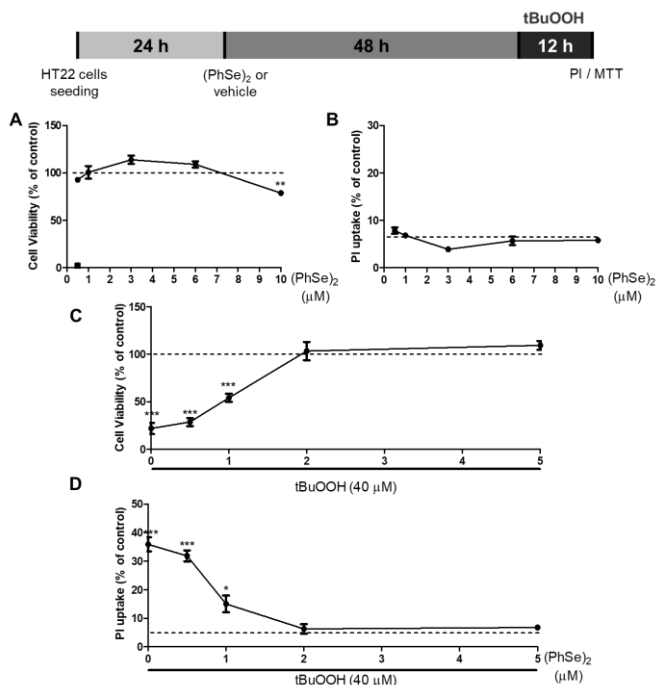


Fig. 2. (PhSe)₂ protects cells against tBuOOH-mediated toxicity. (A-B) HT22 cells were treated with different concentrations of (PhSe)₂ (0.5, 1, 3, 6 and 10 μM) for 48 h. Cell viability and PI uptake were evaluated by MTT reduction and PI uptake, respectively. (C-D) Cells were treated with non-toxic concentrations of (PhSe)₂ (0.5; 1; 2 and 5 μM) for 48 h followed by exposure to tBuOOH (40 μM) for additional 12 h. Cell viability was evaluated by MTT reduction (A; C) and cell death by PI uptake (B; D). Results of MTT assay were expressed as the percentage of MTT reduction with respect to control group. Results of PI assays are expressed as percent of PI uptake, where the 100% of cell death value represent cells treated with 2% Triton X-100 during 15 min. Data are represented as mean ± SEM (A-B; n=4, C-D; n=6). **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 indicate statistical difference from control group (dashed line) by one-way ANOVA followed by the Tukey *post hoc* test.

2.3. *(PhSe)₂ prevents tBuOOH-induced oxidants production in HT22 cells*

Taking into account that tBuOOH-mediated cell damage is commonly related to oxidative stress, we investigated whether (PhSe)₂ protects HT22 cells from tBuOOH-induced oxidants generation. Oxidants-mediated DCFH₂ oxidation was evaluated in HT22 cells within the first 2 hours after tBuOOH exposure (40, 70 and 100 μM). A concentration-dependent increase in oxidants production was observed after tBuOOH exposure (Fig. 3A-B). The treatment with (PhSe)₂ completely prevented the oxidants production in HT22 cells exposed to tBuOOH (40 μM) (Fig. 3C) and partially prevented at higher tBuOOH concentrations (70 – 100 μM) (Fig. 3D-E). Of note, oxidants production was not changed in HT22 cells treated only with (PhSe)₂ (Fig. 3C-E). In accordance, our results using MitoSOX showed that the treatment with (PhSe)₂ (2 μM) for 48 h prevented the peroxide-induced mitochondrial superoxide anion radical production after 4 h of exposure to tBuOOH concentrations (40 – 100 μM) (Fig. 4F).

2.4. *(PhSe)₂ prevents the mitochondrial dysfunction induced by tBuOOH*

Using high-resolution respirometry, the mitochondrial oxygen consumption in intact HT22 was evaluated. The exposure of HT22 cells for 2 or 4 h to 40 μM tBuOOH, concentration which not affect the cell viability (Fig. 1C-D), caused a significant decrease in several mitochondrial oxygen consumption rates (OCR) (Fig. 4A). Already in a short period of tBuOOH exposure (2 h), a significant decrease in the maximal respiration rate and mitochondrial reserve capacity were observed in HT22 cells pretreated with vehicle (DMSO, 0.05%) (black bar) (Fig. 4B). Mitochondrial dysfunction was more evident after 4 h of tBuOOH exposure (compared with 2 h exposure), characterized by a decrease in the basal OCR, the ATP-linked oxygen consumption, the maximum OCR and mitochondrial reserve capacity (black bar) (Fig. 4C). The treatment with 2 μM (PhSe)₂ prevented the mitochondrial dysfunction induced by tBuOOH in HT22 cells (Fig 4).

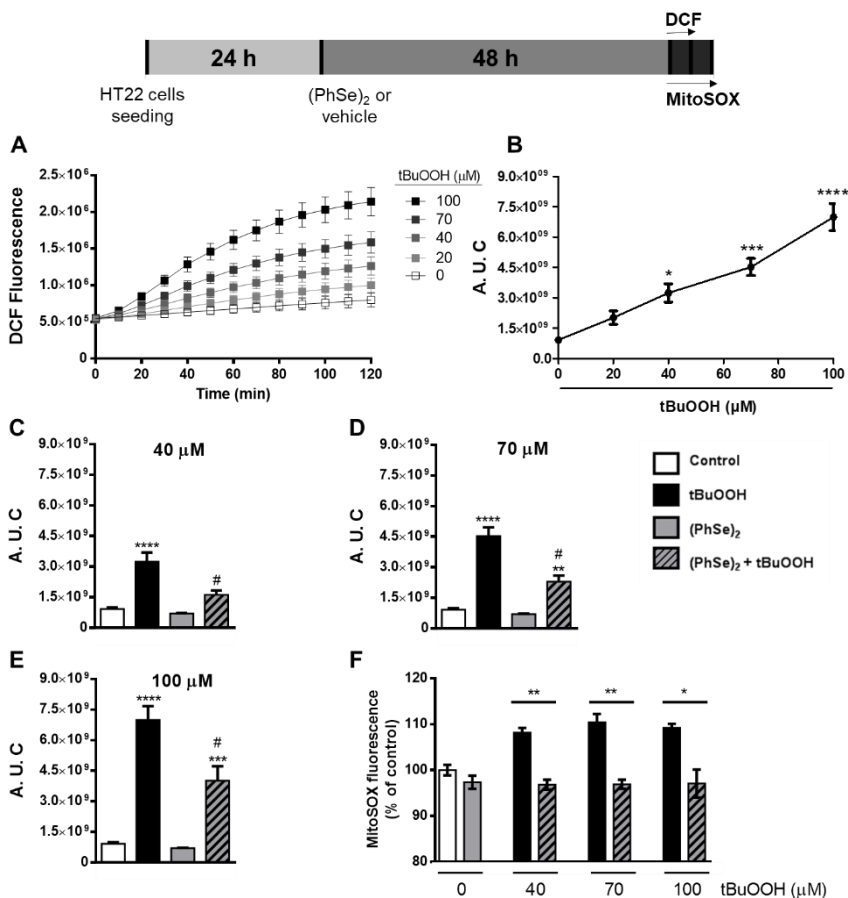


Fig. 3. (PhSe)₂ prevents oxidants production induced by tBuOOH. (A) HT22 cells were exposed to tBuOOH followed by kinetic oxidation of DCFH-DA (1 μM) monitored for 2 hour. Representative time course of oxidants production in HT22 cells exposed to different concentrations of tBuOOH (20, 40, 70 and 100 μM). (B) The kinetic oxidation of DCFH-DA (1 μM) was monitored for 2 hours. Area under the curve (A. U. C) was calculated from the kinetic data shown in figure A. (C-F) HT22 cells were treated with 2 μM of (PhSe)₂ or vehicle (control) for 48 h and then exposed to (C) 40 μM, (D) 70 μM, and (E) 100 μM tBuOOH. (F) MitoSOX assay was recorded after 4 h of tBuOOH exposure. Data are represented as mean ± SEM (n = 5) **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001; *****p*<0.0001 indicate the statistical differences compared to the control group (white bar), #*p*<0.001 indicate the differences between (PhSe)₂ and control group that were exposed to tBuOOH (black bar). One-way (B), Student's t-test (F) or two-way (C-E) ANOVA followed by the Tukey *post hoc* test were realized.

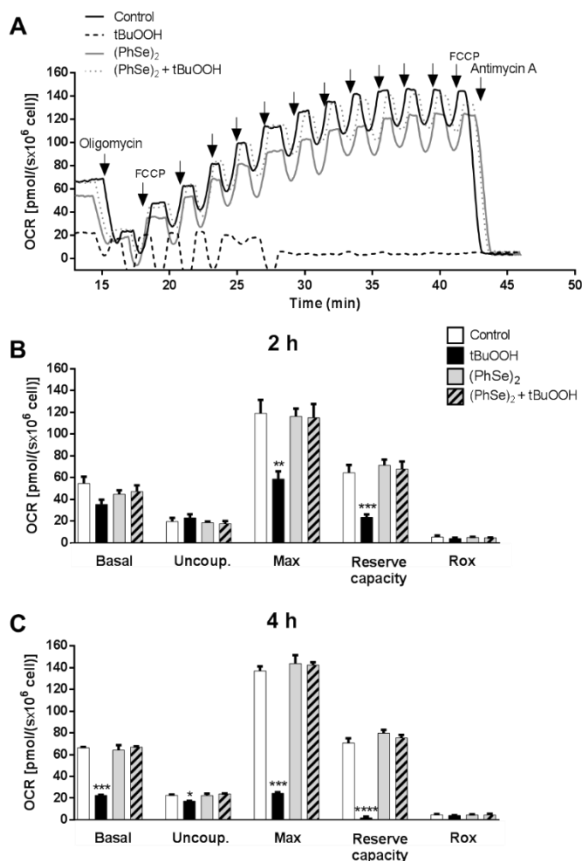


Fig. 4. (PhSe)₂ prevents the mitochondrial dysfunction induced by tBuOOH (A) Representative respirometry assay of intact HT22 cells treated with 2 μ M (PhSe)₂ for 48 h followed the exposure or not with tBuOOH (40 μ M) for additional 4 h. After OCR stabilization, the following electron transport system (ETS) modulators were added: Oligomycin (1.25 μ M) to measure uncoupled respiration; sequential additions (0.5 μ M) of FCCP to achieve maximum respiration; and antimycin A (2.5 μ M) to determine residual oxygen consumption rates. OCR records and mitochondrial reserve capacity of HT22 cells exposed or not with tBuOOH (40 μ M) for 2 h (B) and 4 h (C) were evaluated in DMEM-5% FBS in the following conditions: basal respiration; after inhibition of ATP synthase with oligomycin (uncoupled respiration – Uncoupled.); upon titration with FCCP (maximum respiration – Max); and after inhibition of the respiratory complex III with antimycin A (residual respiration – Rox). Data are represented as mean \pm SEM (n = 4) * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 and **** p < 0.0001 indicate statistical differences compared to the control group (white bar). Two-way ANOVA followed by the Tukey *post hoc* test was realized.

2.5. (PhSe)₂ modulates the glutathione-dependent antioxidant system in HT22 cells

Results from Fig. 5A strongly suggested that (PhSe)₂-treated cells were more efficient to neutralize tBuOOH. The results show an intense tBuOOH-induced decrease in cell viability since concentration as 20 μM, while (PhSe)₂-treated cells resist to the cell death induced by tBuOOH even in high peroxide concentrations tested (20, 40, 70, 100, 200, 400 and 600 μM). Because the glutathione-dependent antioxidant system plays a key role in tBuOOH detoxification, we investigated whether this system, particularly GPx activity, GSH levels, *Gpx* isoforms and *Gclc* gene expression, could be modulated by (PhSe)₂. We found a time-response effect of (PhSe)₂ on its ability to increase the GPx activity (Fig. 5B), reaching a significant increase after 48 h of (PhSe)₂ treatment (around 6-8 fold increase – Fig. 5C). In order to investigate if the (PhSe)₂-induced increase in the GPx activity and GSH levels was correlated with the enzyme gene expression of *Gpx1*, *Gpx4*, and *Gclc*, the quantitative PCR analyses of temporal gene expression (up to 24 h) were performed. Moreover, to evaluate if the gene expression is maintained or modulate in a time greater than 24 h, we performed the analysis of expression after 30 h of (PhSe)₂ treatment. Our results also show a time-dependent increase in the *Gpx1* expression after (PhSe)₂ treatment (Fig. 5D) which persist at 30 h of (PhSe)₂ incubation (around 4 fold increase – Fig 5EF). However, the relative expression of *mtGpx4* was not modulate up to 24 h (Fig. 5F). In the analysis of expression of the copies number of *Gpx4* in after 30 h (PhSe)₂ treatment, *cGpx4* and *mtGpx4* transcripts were not upregulated by the treatment (Fig. 5G-H). Regarding GSH modulation, the results show that (PhSe)₂ caused a significant increase in the GSH (86.2%) and NPSH (62.5%) levels (Fig. 5K – L). Accordingly, (PhSe)₂ treatment caused a time-dependent increase in the *Gclc* expression after (PhSe)₂ treatment (Fig. 5I) and a significant increase (2.3-fold) in the expression of *Gclc* after 30 h of treatment (Fig. 5J), whose encoded protein (glutamate-cysteine ligase) plays a crucial role in the glutathione synthesis pathway.

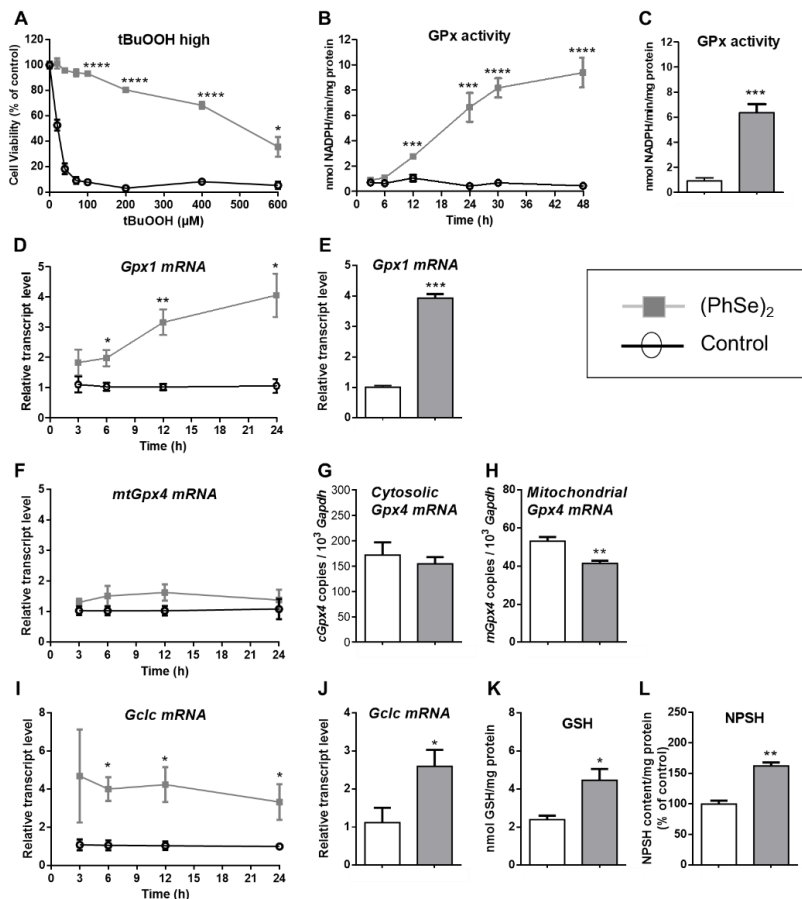


Fig. 5. (PhSe)₂ modulates the glutathione-dependent antioxidant system in HT22 cells. HT22 cells were treated with 2 μM (PhSe)₂ for 48 h followed exposure to tBuOOH concentrations (20 – 100 μM) (A). HT22 cells were treated with 2 μM (PhSe)₂ for 48 h to determination of GPx activity (B-C), GSH content (K), and NPSH content (L). Temporal expression (up to 24 h) of *Gpx* isoforms (D and F) and *Gclc* (I) was evaluated after the 2 μM (PhSe)₂ treatment. Moreover, *Gpx* isoforms (E, G and H) and *Gclc* (J) gene expression at 30 h was evaluated after the 2 μM (PhSe)₂ treatment. Cellular GPx activity is expressed as nmol NADPH consumed per minute per mg of protein. Transcripts levels of *Gpx1* and *Gclc* were normalized with *Gapdh* and calculated by the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method. Copies number of *Gpx4* transcripts of mitochondrial and cytosolic *Gpx4* isoforms were calculated in relation of number copies of *Gapdh* using standard curve of plasmids containing these genes. Values are mean \pm S.E.M (A; n=4, B-C; n=6, D-J, n=4; K, n=4, L; n=3). * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 and **** p <0.0001 indicate statistical difference from control group (Student's t-test).

2.6. Protective effect of (PhSe)₂ depends on the GPx activity modulation

To understand the role of GPx on the protective effect of (PhSe)₂ against tBuOOH-induced toxicity in HT22 cells, we performed an experimental approach using mercaptosuccinic acid (MS), a specific and potent inhibitor of GPx enzyme [36]. HT22 cells were treated with (PhSe)₂ (2 μM) in the presence or absence of MS (5 mM) followed by exposure to tBuOOH (40, 70 and 100 μM). We first showed that MS caused a significant inhibition (about 50%) in the GPx activity in (PhSe)₂-treated cells (Fig. 6A). In addition, the treatment of the cells with MS (5 mM) significantly reversed the protective effect of (PhSe)₂ against tBuOOH-induced toxicity in HT22 cells (Fig. 6B). This event was more evident when HT22 cells were exposed to high concentration of tBuOOH used in this study (100 μM) (Fig. 6B). The data show that GPx activity upregulation is involved in the protection of (PhSe)₂ against tBuOOH-induced toxicity in HT22 cells.

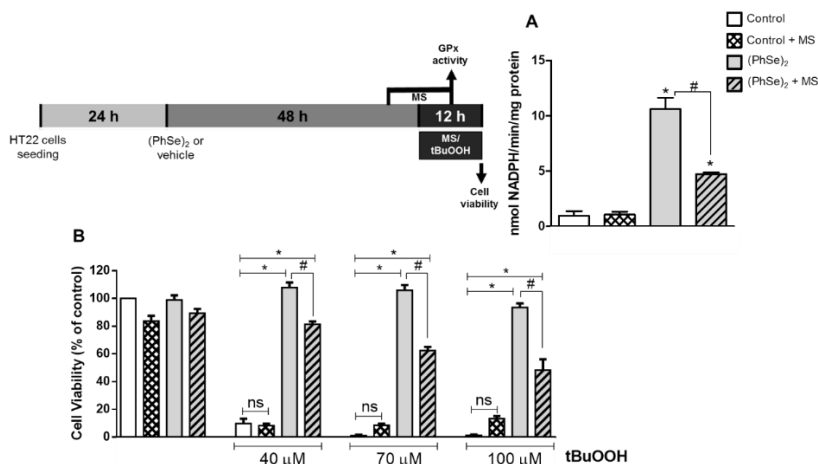


Fig. 6. The inhibition of GPx activity by MS reverses the cytoprotective effect of (PhSe)₂. (A) GPx activity was evaluated in HT22 cells treated with (PhSe)₂ (2 μM) for 43 h followed by incubation with mercaptosuccinic acid (MS) (5 mM, GPx inhibitor) for ~12 h. Results are shown as mean ± SEM (n=3). **p*<0.0001 indicate statistical difference from control group (white bar) and #*p*<0.0001 indicate statistical difference from (PhSe)₂ group without MS (two-way ANOVA followed by the Tukey *post hoc* test). (B) HT22 cells were pretreated with (PhSe)₂ for 48 h and exposed to tBuOOH (40, 70 and 100 μM) for 12 h, in the presence or absence of MS (5 mM). Cell viability was evaluated by MTT reduction. Results are shown as mean ± SEM (n=5). **p*<0.0001 indicate statistical difference from control group (white bar) and #*p*<0.0001 indicate statistical difference between (PhSe)₂ in the presence or not of MS (three-way ANOVA followed by the Tukey *post hoc* test). The data were compared with their respective controls (white bar) for each tBuOOH concentration.

3. Discussion

Neuronal cells are particularly vulnerable to oxidative stress because of its high metabolic rate and relatively low antioxidant defense capability [3]. In these cells, lipid peroxidation, which is stimulated by increased levels of peroxides, can significantly disrupt cellular function and therefore lead to death [4]. Particularly in the brain, enzymes of the GPx family, in association with other peroxidases, orchestrate an adaptive response to oxidative stress by directly reducing peroxides, favoring neuronal survival [5,21]. In this scenario, a significant effort has been done to develop molecules that mimic the peroxidase activity of the GPx, such as synthetic organoselenium compounds [38]. Among these compounds, (PhSe)₂, a diselenide GPx mimetic, has shown significant beneficial effects in several models of oxidative stress-related pathologies (for a review, see Nogueira and Rocha [22]). Here, we propose (PhSe)₂ as a promising therapeutic approach to prevent the neuronal damage related to oxidative stress. Our results showed that the potent cytoprotective action of (PhSe)₂ in preventing the mitochondrial dysfunction and oxidative stress promoted by tBuOOH was due to an induction of an adaptive cellular antioxidant response.

Oxidative stress and mitochondrial dysfunction have been reported as critical factors in the pathophysiology of neurodegenerative diseases [1,23]. Although, the oxidants production is part of cellular homeostasis, their overproduction cause mitochondrial dysfunction that can culminate in energetic impairment and cell death [24,25]. According to previous studies [26–28], here we observed an intense production of oxidants induced by tBuOOH exposure in HT22 cells from the first minutes of exposure (Fig. 3) that promoted mitochondria dysfunction culminating later in cell death. By contrast, the treatment of cells with a nontoxic concentration of (PhSe)₂ rendered cells more efficient in detoxifying tBuOOH (or derived oxidants), which in turn prevented the cell death, showing that these cells can cope better with pro-oxidant situations. This *in vitro* observation can better explain the neuroprotective effect of (PhSe)₂ previously described in *in vivo* models of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer disease (AD) [11] and neurotoxicity (CdCl₂, H₂O₂, methimazole, and ischemia/reperfusion) [29–32].

Mitochondria are also critical regulators of cell death [33,34]. Many lines of evidence suggest that mitochondrial dysfunction occurs early and acts causally in neurodegenerative disease pathogenesis [1]. Therefore, protection of mitochondrial integrity and function is emerging as a promising strategy to prevent neuronal damage. As expected, the intense oxidants production induced by tBuOOH caused a fast and significant impact on mitochondrial function in HT22 cells. Decreases in the maximum OCR and mitochondrial reserve capacity were observed as early as 2 hours of exposure to tBuOOH (40 μM) (Fig. 4B), therefore before the induction of cell death (which occur in 12 hours – Fig. 1C). A slightly longer exposure to the tBuOOH (4 hours) further impaired the mitochondrial function by reducing the basal OCR, the ATP-linked oxygen consumption, the maximum OCR and mitochondrial reserve capacity (Fig. 4C). The excessive amount of oxidants produced by tBuOOH would leads to oxidation of mitochondrial proteins resulting in mitochondrial dysfunction, bioenergetic impairment and exponential production of oxidants. In fact, the decrease in mitochondrial reserve capacity has been described as a strong indicator of mitochondrial dysfunction

[35]. Similarly, a loss of mitochondrial reserve capacity was observed in photoreceptor cells exposed to tBuOOH [36]. Interestingly, our results indicate that the treatment with (PhSe)₂ was efficient in preventing mitochondrial dysfunction induced by tBuOOH probably by neutralizing this peroxide or derived oxidants. In agreement with these data, previous studies from our group has demonstrated that (PhSe)₂ improve the mitochondrial reserve capacity and therefore prevented oxidant-induced mitochondrial dysfunction in endothelial cells [15,37]. Although, our results showed that (PhSe)₂ protects HT22 cells from tBuOOH-induced mitochondrial dysfunction, we did not observed its ability in increase mitochondrial reserve capacity (Fig. 4). Together, these findings reinforce the idea that (PhSe)₂ can maintain the mitochondrial function in oxidative stress conditions, thus preserving the bioenergetic and functional integrity of mitochondria in HT22 neuronal cells exposed to tBuOOH.

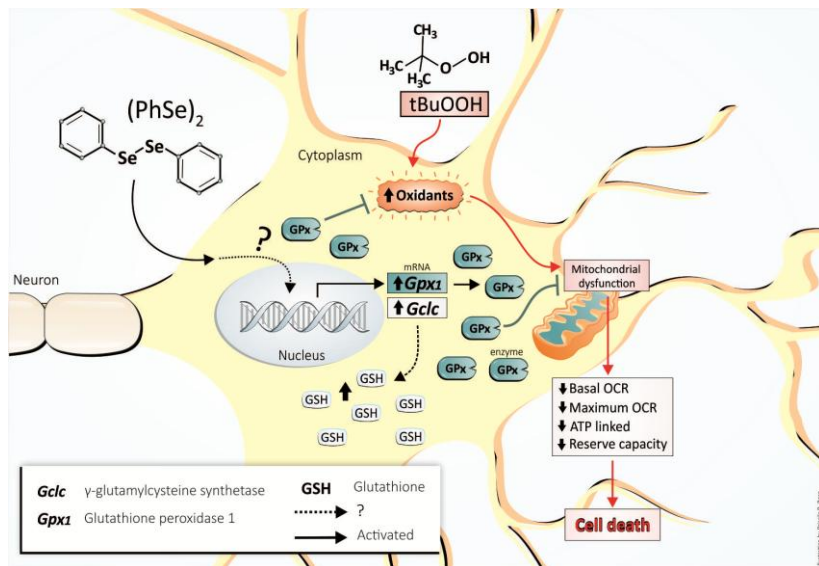
Recent studies postulate that the antioxidant property of (PhSe)₂ goes far beyond its mimic action to the GPx [14,37]. In fact, the protective action of (PhSe)₂ was observed at a low concentration (2 μM) and time-dependent, discarding an exclusive scavenger effect linked to its peroxidatic activity. Additionally, it is important to consider that the simple thiol-peroxidase activity of (PhSe)₂, is approximately 3 to 4 order lower than that of native GPxs (Bartolini et al., 2015), seem to be not enough to justify its well-reported antioxidant properties in biological systems [17]. Based on our first results (Figs. 1-3), we hypothesized that the effect of (PhSe)₂ in preserving mitochondrial function and cell survival could be due to the increase in cellular antioxidant defenses. Our results showed that (PhSe)₂ positively modified the glutathione-dependent antioxidant system in HT22 cells by increasing the gene expression of *Gpx1* and the GPx activity, as well as the level of its substrate, GSH through the increase in the gene expression of *Gclc* (a gene encoding γ-glutamylcysteine synthetase, which is the limiting enzyme in the GSH pathway (Fig. 5). This fast and efficient cellular antioxidant modulation mediated by (PhSe)₂ made these cells more resistant to oxidative damage. It is known that GSH is part of the glutathione peroxidase system, as an electron donor that reacts directly with free radicals [38] and its reduction has been associated with a loss of the brain antioxidant defense in neurodegenerative conditions [39]. In this context, compounds that may induce an increase or renewal of GSH levels are of great relevance in future therapies for neurodegenerative diseases. Together these evidences reinforce the idea that this simple organoselenium compound acts as an indirect and effective antioxidant by modulating intracellular redox-sensitive responses.

To evaluate the contribution of GPx activity on the cytoprotective effect of (PhSe)₂, we exposed (PhSe)₂-treated HT22 cells to MS, an inhibitor of the GPx enzyme, slightly before tBuOOH exposure. Our results showed that the MS decrease the effect of (PhSe)₂ in protecting HT22 cells against cell death induced by exposure to different concentrations of tBuOOH. Therefore, our results indicate that the positive modulation of *Gpx1* expression will be a key component for the protection afforded by (PhSe)₂ in HT22 cells. It should be mentioned the importance of GPx activity, since its decrease promote susceptibility to oxidative stress by allowing the accumulation of harmful oxidants [40,41], and because other selenoproteins cannot replace its function in protecting from generalized oxidative stress [5]. *Gpx4* gene expression was not upregulated after that (PhSe)₂ treatment and the results of decrease observed in the *mtGpx4* expression would not

represent a biological significance event according to functional thresholds used in quantitative PCR analyses [42]. We can suppose that *Gpx1* isoform would be preferentially synthesized in (PhSe)₂-treated HT22 cells, suggesting an interplay between the different isoforms and also suggest that (PhSe)₂ regulates *Gpx1*-specific transcriptional machinery in HT22 cells that does not involve *Gpx4*. Contrary to our results, (PhSe)₂ did not increase the GPx activity and protein expression in neuroblastoma cells [43], indicating that these cells would present a different physiological response than those found in HT22 cells.

We considered that partially disclose the molecular mechanism of (PhSe)₂ in HT22 cells involvement GPx modulation. Additional antioxidant enzymes might be involved in the observed protective effects of (PhSe)₂. In fact literature data have shown that (PhSe)₂ promoted of translocation of Nrf2 in endothelial cells (de BEM et al., 2013), which is known by regulate the genic expression of antioxidant enzymes [44,45]. Moreover, (PhSe)₂ increased the expression of peroxideroxin 3 in endothelial cells, whose gene is a specific target of FoxO [15]. It is likely that the Nrf2 and/or Fox-dependent signaling cascade also would participate for increase the antioxidant responses observed in our study. However, further studies are necessary to provide details of this participation of these transcription factors and other mechanisms in the protection of (PhSe)₂ in HT22 cells.

Finally, we propose in the Scheme 1 some molecular mechanisms activated by (PhSe)₂ in HT22 cells that allow the protection against the oxidative stress induced by tBuOOH. Our results demonstrated that (PhSe)₂ orchestrated an adaptive cellular response to oxidative stress through *Gpx1* modulation, which allowed cells to neutralize oxidants and, as consequence, prevent mitochondrial dysfunction and cell death. This study shows that the cytoprotective effects of (PhSe)₂ goes far beyond its well-known thiol-peroxidase activity. In contrast with the findings obtained in simple chemical systems, where organoselenium compounds exhibits thiol-peroxidase-like activity, in the complex scenario of living neuronal cells, (PhSe)₂ has indirect GPx-like activity. Importantly, in view of the much better efficiency of native GPx enzymes over simple organoselenium compounds, the thiol modifiers properties of (PhSe)₂ and analogs have to be exploited in the searching for effective antioxidant therapeutic agents.



Scheme 1. Representative scheme of the protective effect of Diphenyl diselenide on modulating of the glutathione-dependent antioxidant system for protect neuronal cells against oxidative stress and mitochondrial dysfunction induced by *t*BuOOH. Red arrows indicate the effect of *t*BuOOH on the cells and black arrows indicate the protective effect of (PhSe)₂.

4. Material and methods

4.1. Reagents

β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt reduced (NADPH), dimethyl sulfoxide (DMSO), glutathione reductase from baker's yeast, reduced glutathione, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), propidium iodide (PI), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH₂-DA), 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic-acid) (DTNB), *tert*-butyl hydroperoxide (*t*BuOOH), mercaptosuccinic acid (MS), proton ionophore carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), antimycin A and oligomycin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Gibco Life Technologies (Carlsbad, CA). MitoSOX™ Red probe was obtained from Invitrogen (USA). RQ1 RNase-Free DNase, GoScript™ Reverse Transcription System and GoTaq qPCR Master Mix were purchased from Promega Corporation (USA). All other chemicals were of the highest grade available commercially.

4.2. Cell Culture

The HT22 cells, an immortalized mouse hippocampal neuronal cell line, were a gift from Dr. David Schubert (Salk Institute, La Jolla, CA, USA). HT22 cells were maintained in DMEM supplemented with 5% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Gibco/Invitrogen), 2 mM glutamine, 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 10 mM HEPES, 24 mM glucose, 44 mM NaHCO₃ and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Cells were subcultured at confluences of 80-90%, and used between the 3rd and 12th passages. Cell suspensions were seeded in dish plates (100x20 mm), 96-, or 6-well plaques at different cell densities, depending on the experimental procedure, as described below.

4.3. Cell Viability Assays

Cell viability was measured by two different assays: MTT reduction and PI uptake. For these assays, cells were plated into 96-well plates at a cell density of 1×10^3 cells/well and cultivated for 24 h. In order to determine the tBuOOH toxicity, HT22 cells were pretreated with 0.05% DMSO (used as vehicle in further experiments) and maintained in culture for additional 48 h. Then, cells were exposed to tBuOOH (10, 20, 40, 70 and 100 µM) for 12 h; - to determine the timeline of tBuOOH toxicity, cells were incubated with tBuOOH (40 µM) for 2, 4, 5, 6, 7, 9 and 12 h. In parallel experiments, cells were incubated with (PhSe)₂ (0.5, 1, 3, 6 and 10 µM) for 48 h in order to evaluate the concentration-response effect of (PhSe)₂ *per se*; - to evaluate the protective effect of (PhSe)₂, cells were pretreated with nontoxic concentration of (PhSe)₂ (0.5, 1, 2 and 5 µM) or vehicle (DMSO, 0.05%) during 48 h. Afterward, the medium was replaced by a fresh medium and cells were exposed to tBuOOH (40 µM) for 12 h. To establish potential mechanisms involved in the cytoprotective effect of (PhSe)₂ cells were pretreated with (PhSe)₂ (2 µM) or vehicle (DMSO, 0.05%) during 48 h and then 5 mM mercaptosuccinic acid (MS-inhibitor the GPx activity) was added 30 min before the exposure to tBuOOH (40, 70 and 100 µM) for additional 12 h. tBuOOH was diluted in water and always prepared at the time of use. The reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) to the formazan product by mitochondrial dehydrogenases in viable cells was conducted as described by Mosmann [27]. Propidium iodide (PI), which is excluded by living cells but rapidly enters cells with damaged membranes and binds to DNA, rendering them brightly fluorescent, was measured according to Riccardi and Nicoletti [28]. Results of MTT assays were expressed as percentage of untreated cells and the results of PI uptake assays were expressed as percentage of 2% Triton X-100-treated cells that represent the 100% of death. All experiments were performed in triplicate and read on a spectraMax Paradigm spectrofluorometer (Molecular Devices).

4.4. Measurement of Oxidants Production

Intracellular oxidants production was detected using the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH₂-DA) and mitochondrial superoxide radical generation was measured using MitoSOX probe. HT22 cells (1×10^3 cells/well) were plated into 96-well plates for 24 h and then pretreated with (PhSe)₂

(2 μM) or vehicle (DMSO, 0.05%) for 48 h. Afterward DCFH₂-DA (1 μM) was added to the culture medium and incubated for 30 min, at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. In parallel, MitoSOX (5 μM) was dissolved in medium HBSS and was added in HT22 cells pretreated, and incubated for 15 min at 37°C. In both experiments, the medium was removed and fresh Hanks' balanced salt solution (HBSS) was added, and then cells were treated with tBuOOH (40, 70 and 100 μM). The fluorescence of DCF (485 nm excitation and 520 nm emission) inside the cells was immediately measured after tBuOOH addition (during 2 h at each 10 minutes) and used to evaluate the oxidants production. Results were expressed as Area Under the Curve (A.U.C) and compared to the control (vehicle). The fluorescence of MitoSOX (510 nm excitation and 580 nm emission) was immediately measured after tBuOOH (40, 70 and 100 μM) addition (in 4 h) and the results were expressed as percentage of untreated cells. All experiment were performed in triplicate and read on a spectraMax Paradigm spectrofluorometer (Molecular Devices).

4.5. High-resolution respirometry of intact cells

To evaluate the mitochondrial oxygen consumption, HT22 cells (3 x 10⁵ cells/plate) were plated into Petri plates for 24 h. After, cells were pretreated with (PhSe)₂ (2 μM) or vehicle for 48 h followed by tBuOOH (40 μM) exposure for 2 h or 4 h. Approximately one million suspended cells (in DMEM 5% FBS) were charged in OROBOROS Oxygraph-2k chambers under continuous stirring at 750 r.p.m. at 37°C. After stabilization of the signal, basal oxygen consumption rates (OCR) was recorded, which is defined as respiration with the physiological substrates in growth medium. ATP synthase was inhibited with oligomycin (1.25 μM) and uncoupled OCR was recorded. Then, the proton ionophore carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP, uncoupler of oxidative phosphorylation) was used in 0.5 μM steps to determination the maximum OCR or maximum respiratory capacity. Respiration was inhibited by application of 2.5 μM antimycin A to determine the non-mitochondrial OCR (residual oxygen consumption - ROX). DatLab software (Oroboros Instruments) was used for data acquisition and analysis. The difference in OCR was compared with the control group (vehicle).

4.6. Assessment of Glutathione Peroxidase (GPx) Activity

HT22 cells (1 x 10⁵ cells/well) were seeded for 24 h in 6-well plates and pretreated with (PhSe)₂ (2 μM) or vehicle (DMSO, 0.05%) for additional 48 h. In another experimental set, cells were pretreated with (PhSe)₂ (2 μM) or vehicle (DMSO, 0.05%) for 43 h, and incubated with Mercaptosuccinic acid (MS; 5 mM) for additional 12 h. After treatments, the medium was aspirated and the cells were washed once with phosphate-buffered saline (PBS), trypsinized and suspended (1:1 ratio) in DMEM 5% FBS. Cell suspension were centrifuged at 500 x g for 2 min at room temperature and the cell pellets were stored at -80°C until assay. For GPx assay, cell pellets were suspended in 50 μL of buffer (20 mM TrisHCl, 0.25 M sucrose; containing 0.4 mM β -mercaptoethanol) at pH 7.4 on ice. The samples were sonicated for 5 min (three times) on ice with vortex of 20 seconds to each sonicate time, and centrifuged at 10,000 x g for 15 min at 4°C. The supernatant was collected and used for kinetic GPx activity assay (10 μL /well). GPx activity

was performed by measuring the consumption of NADPH at 340 nm [46] and optimized conditions for HT22 cell lysate described by Panee et al. [47]. The following reagents and concentrations were used: t-butyl hydroperoxide (0.32 mM), GSH (1.88 mM), GR (84 mU/ml), EDTA (1 mM), NaN₃ (1 mM), NADPH (0.2 mM) and Tris-HCl pH 7.6 (0.1 M). The experiments were performed in triplicate and read on a spectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices). The results were expressed as nmol NADPH consumed per min per milligram of protein.

4.7. Determination of Glutathione (GSH) and nonproteic thiols (NPSH) content

GSH and NPSH content were determined using a fluorimetric assay described by Hissin and Hilf [48] and a spectrophotometric assay as described by Ellman [49], respectively. HT22 cells (1×10^5 cells/well) were seeded for 24 h in 6-well plates and pretreated with (PhSe)₂ (2 μ M) or vehicle (DMSO, 0.05%) for 48 h. Then, cells were harvested in 150 μ L of PBS buffer (0.05% Triton X-100, pH 7.4) and mixed in a trichloroacetic acid 10% solution. After centrifugation (5000 x g at 4°C for 10 min), supernatant was used to determine GSH and NPSH content. A volume of 30 μ L of supernatant was incubated with 10 μ L of ortho-phthalaldehyde (0.1% w/v in methanol) and 160 μ L of 100 mM Na₂HPO₄ for 15 min at room temperature to fluorimetric assay. A volume of 50 μ L of supernatant was incubated with 25 μ L of DTNB (10 mM) and 125 μ L of potassium phosphate buffer (1 M) for 15 min at room temperature to spectrophotometry assay. Fluorescence intensity (350 nm excitation and 420 nm emission) and spectrophotometry (absorbance 412 nm) assay were read on a spectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices). Cellular GSH and NPSH contents were calculated by using concurrently run standard curve of GSH. The results were expressed as nmol GSH per milligram of protein or percent of control group (vehicle).

4.8. Protein quantification

Protein quantification was performed by Lowry method [50], using bovine serum albumin as standard.

4.9. Transcript level of *Gpx1*, *Gclc* and copies number of *Gpx4* by RT-qPCR

To evaluate the transcript level of *Gpx1*, γ -glutamylcysteine synthetase (*Gclc*) and *Gpx4*, HT22 cells (1×10^5 cells/well) were seeded in 6-well plates and cultivated for 24 h. Then, cells were pretreated with (PhSe)₂ (2 μ M) or vehicle (DMSO, 0.05%) during 30 h. Total RNA was extracted in different times of treatment (3 h, 6 h, 12 h, 24 h and 30 h) using Tri-reagent (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. DNA contamination of samples was removed by treatment with RQ1 RNase-Free DNase (Promega) at 25°C for 1 h. After, RNA samples (90 μ L) were precipitated with 10 μ L acetate sodium (3 M) and 100 μ L of isopropyl alcohol at room ambient for 10 min. After the centrifugation at 12,000 x g for 10 min, the pellet was washed with 70% ethanol and centrifuged at 12,000 x g for 10 min. PCR of β -act gene was realized to verify the effectiveness of DNase treatment. RNA concentrations and quality were determined using spectrophotometry (BIO-5000-BI/ KASUAKI). RNA samples with A260/280 and A260/230 absorbance ratio > 1.8 were considered acceptable for cDNA synthesis.

The integrity of total RNA was determined by 1.5% agarose gel electrophoresis. For cDNA synthesis, GoScript™ Reverse Transcription System (Promega) were used according to the manufacturer's instructions. The reaction (20 µL) consisted of 1 µg of total RNA, Oligo(dT)₁₅ primer (0.25 µg), 4 µL of GoScript 5X Reaction Buffer, GoScript Reverse Transcriptase (160 U, Promega), 0.5 mM of each dNTP, 2.5 mM MgCl₂, and ribonuclease inhibitor (20 U). First, RNA samples and Oligo(dT)₁₅ were mixed, incubated at 70°C for 5 min and immediately placed on ice for 5 min. After, other components were added and runs at 25°C for 5 min, 42°C for 60 min, and 70°C for 15 min.

Real time PCR was carried out in 96-well plates using the 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), and was performed with GoTaq qPCR Master Mix (Promega). Sequences of primers of the genes are indicated in the Table 1. The qPCR reaction (10 µL) consisted of 1 µL of 10-fold diluted cDNA, 0.3 µL of each primer (10 µM), 5 µL of master mix (2X), 0.1 µL of CXR and 3.3 µL DEPC-water. The thermal cycling program was as follows: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, 40 amplification cycles of 95°C for 15 sec and 60°C or 62°C for 1 min, and a melting curve analysis at 95°C for 15 sec, 60°C for 15 sec, and 95°C for 15 sec. Each sample was analyzed in technical duplicate. The amplification efficiency (E) was calculated according to the equation $E = 10^{(1/\text{slope})}$ from a standard curve of five-fold serial dilutions (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160) of pooled cDNA. Efficiency of 1.9 to 2.1 and Pearson's coefficients of determination (R²) of each gene > 0.99 were considered for RT-qPCR. *β-act* gene was used to normalize the transcript levels of *Gpx1* and *Gclc*, and calculated by the 2^{-ΔΔCT} method [51]. To determine the copies number of *Gpx4*, a ten-fold series dilution (10⁸ to 10⁴ copies) of pGEM-T plasmid carrying the fragment of *mtGpx4* (mitochondrial *Gpx4*) or *cGpx4* (cytoplasmic *Gpx4*) or *Gapdh* was made and used as standard curves for absolute quantification by qPCR [52].

Table 1 Primer sequences used for RT-qPCR experiments

Gene		Primer sequence (5' – 3')	Amplicon size (bp)	AT (°C)	Reference
Symbol	Name				
<i>Gpx1</i>	<i>Glutathione peroxidase 1</i>	CTCACCCGCTCTTTACCTTC CAAAGTTCCAGGCAATGTGC	129	60	Quispe et al. [20]
<i>mtGpx4</i>	<i>Mitochondrial glutathione peroxidase 4</i>	CGCCGAGATGAGCTGG GTCGATGTCTTGCTGAG	158	60	Casañas-Sánchez et al. [53]; Quispe et al. [20]
<i>mcGpx4</i>	<i>Mitochondrial and cytosolic glutathione peroxidase 4</i>	GTCTGGCAGGCACCATGT GTCGATGTCTTGCTGAG	83	60	Quispe et al. [20]
<i>Gclc</i>	<i>Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit</i>	TTACCGAGGCTACGTGCAGAC TGTCGATGGTCAGGTCGATGTC	200	62	Kurauchi et al. [54]
<i>β-act</i>	<i>β-actin</i>	CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG TGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG	138	60	Flowers et al. [55]
<i>Gapdh</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG ATGCCAGTGAGCTTCCCCTTTCAG	153	60	Know et al. [56]

AT: Annealing temperature

4.10. Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed using the STATISTICA software system, version 8.0. (StatSoft, Inc., 2008). Normal (Gaussian) distribution and homogeneity of variance were evaluated with the Kolmogorov–Smirnov test and Levene's test, respectively. Significant differences were evaluated by Student's t test, one-way, two-way or three-way analysis of variance (ANOVA), depending on the experimental design. Multiple comparisons were performed using the Tukey *post-hoc* test. Results are expressed as mean \pm SEM. $p < 0.05$ was considered statistically significant. All graphics were made using the GraphPad PRISM® software version 6.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Acknowledgements

The financial support by (i) Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC), (ii) Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and (iii) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) is gratefully acknowledged. MF, AFB, and ALB are CNPq fellowship recipients. Part of the work was performed with the support from LAMEB (Laboratório Multiusuário de Ciências Biológicas—UFSC), whose technicians are gratefully acknowledged. The authors are also thankful to CEBIME-UFSC for mass analyses.

References

- [1] M.T. Lin, M.F. Beal, Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Nature*. 443 (2006) 787–795. doi:10.1038/nature05292.
- [2] S. Neitemeier, A.M. Dolga, B. Honrath, S.S. Karuppagounder, I. Alim, R.R. Ratan, C. Culmsee, Inhibition of HIF-prolyl-4-hydroxylases prevents mitochondrial impairment and cell death in a model of neuronal oxytosis, *Cell Death Dis.* 7 (2016) e2214. doi:10.1038/cddis.2016.107.
- [3] S. Fernandez-Fernandez, A. Almeida, J.P. Bolaños, Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes, *Biochem. J.* 443 (2012) 3–11. doi:10.1042/BJ20111943.
- [4] J.T. Coyle, P. Puttfarcken, Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders, *Science*. 262 (1993) 689–695. doi:10.1126/science.7901908.
- [5] R. Brigelius-Flohé, M. Maiorino, Glutathione peroxidases, *Biochim. Biophys. Acta.* 1830 (2013) 3289–3303.
- [6] G. Trépanier, D. Furling, J. Puymirat, M.E. Mirault, Immunocytochemical localization of seleno-glutathione peroxidase in the adult mouse brain, *Neuroscience*. 75 (1996) 231–243. doi:10.1016/0306-4522(96)00222-9.
- [7] G. Cozza, M. Rossetto, V. Bosello-Travain, M. Maiorino, A. Roveri, S. Toppo, M. Zaccarin, L. Zennaro, F. Ursini, Glutathione peroxidase 4-

- catalyzed reduction of lipid hydroperoxides in membranes: the polar head of membrane phospholipids binds the enzyme and addresses the fatty acid hydroperoxide group toward the redox center, *Free Radic. Biol. Med.* 112 (2017) 1–11. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.07.010.
- [8] H. Wang, E. Cheng, S. Brooke, P. Chang, R. Sapolsky, Over-expression of antioxidant enzymes protects cultured hippocampal and cortical neurons from necrotic insults, *J. Neurochem.* 87 (2003) 1527–1534. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.02123.x.
- [9] L. Orian, S. Toppo, Organochalcogen peroxidase mimetics as potential drugs: A long story of a promise still unfulfilled, *Free Radic. Biol. Med.* 66 (2014) 65–74. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.006.
- [10] T.B. Sampaio, S. Pinton, J.T. da Rocha, B.M. Gai, C.W. Nogueira, Involvement of BDNF/TrkB signaling in the effect of diphenyl diselenide on motor function in a Parkinson's disease rat model, *Eur. J. Pharmacol.* 795 (2017) 28–35. doi:10.1016/j.ejphar.2016.11.054.
- [11] D.C. Zamberlan, L.P. Arantes, M.L. Machado, R. Golombieski, F.A.A. Soares, Diphenyl-diselenide suppresses amyloid- β peptide in *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease, *Neuroscience*. 278 (2014) 40–50. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.07.068.
- [12] V. Glaser, B. Moritz, A. Schmitz, A.L. Dafré, E.M. Nazari, Y.M.R. Müller, L. Feksa, M.R. Straliozzo, A.F. de Bem, M. Farina, J.B.T. da Rocha, A. Latini, Protective effects of diphenyl diselenide in a mouse model of brain toxicity, *Chem. Biol. Interact.* 206 (2013) 18–26. doi:10.1016/j.cbi.2013.08.002.
- [13] J.T. da Rocha, B.M. Gai, S. Pinton, T.B. Sampaio, C.W. Nogueira, G. Zeni, Effects of diphenyl diselenide on depressive-like behavior in ovariectomized mice submitted to subchronic stress: involvement of the serotonergic system, *Psychopharmacology (Berl)*. 222 (2012) 709–719. doi:10.1007/s00213-012-2675-3.
- [14] A.F. de Bem, B. Fiuza, P. Calcerrada, P.M. Brito, G. Peluffo, T.C.P. Dinis, M. Trujillo, J.B.T. Rocha, R. Radi, L.M. Almeida, Protective effect of diphenyl diselenide against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: a comparison with ebselen, Nitric Oxide - *Biol. Chem.* 31 (2013) 20–30. doi:10.1016/j.niox.2013.03.003.
- [15] B. Fiuza, N. Subelzú, P. Calcerrada, M.R. Straliozzo, L. Piacenza, A. Cassina, J.B.T. Rocha, R. Radi, A.F. de Bem, G. Peluffo, Impact of SIN-1-derived peroxynitrite flux on endothelial cell redox homeostasis and bioenergetics: protective role of diphenyl diselenide via induction of peroxiredoxins, *Free Radic. Res.* 49 (2015) 122–132. doi:10.3109/10715762.2014.983096.
- [16] M.R. Straliozzo, M.A. Hort, B. Fiuza, J.B.T. Rocha, M. Farina, G. Chiabrando, A.F. de Bem, Diphenyl diselenide modulates oxLDL-induced cytotoxicity in macrophage by improving the redox signaling, *Biochimie*.

- 95 (2013) 1544–1551. doi:10.1016/j.biochi.2013.04.008.
- [17] N. V Barbosa, C.W. Nogueira, P.A. Nogara, A.F. de Bem, M. Aschner, J.B.T. Rocha, Organoselenium compounds as mimics of selenoproteins and thiol modifier agents, *Metallomics*. 9 (2017) 1703–1734. doi:10.1039/c7mt00083a.
- [18] D. Bartolini, M. Piroddi, C. Tidei, S. Giovagnoli, D. Pietrella, Y. Manevich, K.D. Tew, D. Giustarini, R. Rossi, D.M. Townsend, C. Santi, F. Galli, Reaction kinetics and targeting to cellular glutathione S-transferase of the glutathione peroxidase mimetic PhSeZnCl and its d,l-poly lactide microparticle formulation, *Free Radic. Biol. Med.* 78 (2015) 56–65. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.008.
- [19] J. Liu, L. Li, W.Z. Suo, HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties, *Life Sci.* 84 (2009) 267–271. doi:10.1016/j.lfs.2008.12.008.
- [20] R.L. Quispe, R.F.S. Canto, M.L. Jaramillo, F.A.R. Barbosa, A.L. Braga, A.F. de Bem, M. Farina, Design, synthesis, and *in vitro* evaluation of a novel probucol derivative: protective activity in neuronal cells through GPx upregulation, *Mol. Neurobiol.* (2018). doi:10.1007/s12035-018-0939-6.
- [21] P.J. Crack, J.M. Taylor, N.J. Flentjar, J. De Haan, P. Hertzog, R.C. Iannello, I. Kola, Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to ischemia/reperfusion injury, *J. Neurochem.* 78 (2001) 1389–1399. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00535.x.
- [22] C.W. Nogueira, J.B.T. Rocha, Diphenyl diselenide a janus-faced molecule, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 2055–2071. doi:10.1590/S0103-50532010001100006.
- [23] S. Gandhi, A.Y. Abramov, Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012 (2012) 1–11. doi:10.1155/2012/428010.
- [24] J.F. Turrens, Mitochondrial formation of reactive oxygen species, *J. Physiol.* 552 (2003) 335–344. doi:10.1111/j.1469-7793.2003.00335.x.
- [25] J.P. Bolaños, M.A. Moro, I. Lizasoain, A. Almeida, Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: Therapeutic implications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 1299–1315. doi:10.1016/j.addr.2009.05.009.
- [26] K. Haidara, I. Morel, V. Abaléa, M. Gascon Barré, F. Denizeau, Mechanism of tert-butylhydroperoxide induced apoptosis in rat hepatocytes: involvement of mitochondria and endoplasmic reticulum, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1542 (2002) 173–185. doi:10.1016/S0167-4889(01)00178-1.
- [27] J.P. Piret, T. Arnould, B. Fuks, P. Chatelain, J. Remacle, C. Michiels,

- Mitochondria permeability transition-dependent tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis in hepatoma HepG2 cells, *Biochem. Pharmacol.* 67 (2004) 611–620. doi:10.1016/j.bcp.2003.09.026.
- [28] H. Lv, Q. Liu, J. Zhou, G. Tan, X. Deng, X. Ci, Daphnetin-mediated Nrf2 antioxidant signaling pathways ameliorate tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)-induced mitochondrial dysfunction and cell death, *Free Radic. Biol. Med.* 106 (2017) 38–52. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.016.
- [29] C. Luchese, R. Brandão, R. de Oliveira, C.W. Nogueira, F.W. Santos, Efficacy of diphenyl diselenide against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium in mice, *Toxicol. Lett.* 173 (2007) 181–190. doi:10.1016/j.toxlet.2007.07.011.
- [30] T. Posser, J.L. Franco, D.A. dos Santos, A.P. Rigon, M. Farina, A.L. Dafré, J.B. Teixeira Rocha, R.B. Leal, Diphenyl diselenide confers neuroprotection against hydrogen peroxide toxicity in hippocampal slices, *Brain Res.* 1199 (2008) 138–147. doi:10.1016/j.brainres.2008.01.004.
- [31] G.R.M. Dias, T.M. de Almeida, J.H. Sudati, F. Dobrachinski, S. Pavin, F.A.A. Soares, C.W. Nogueira, N.B.V. Barbosa, Diphenyl diselenide supplemented diet reduces depressive-like behavior in hypothyroid female rats, *Physiol. Behav.* 124 (2014) 116–122. doi:10.1016/j.physbeh.2013.10.036.
- [32] F. Dobrachinski, M.H. da Silva, C.L.C. Tassi, N.R. de Carvalho, G.R.M. Dias, R.M. Golombieski, E.L. da Silva Loreto, J.B.T. da Rocha, M.R. Figuera, F.A.A. Soares, Neuroprotective effect of diphenyl diselenide in a experimental stroke model: maintenance of redox system in mitochondria of brain regions, *Neurotox. Res.* 26 (2014) 317–330. doi:10.1007/s12640-014-9463-2.
- [33] D.J. Granville, R.A. Gottlieb, Mitochondria: regulators of cell death and survival, *ScientificWorldJournal.* 2 (2002) 1569–1578. doi:10.1100/tsw.2002.809.
- [34] S.W.G. Tait, D.R. Green, Mitochondrial regulation of cell death., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5 (2013) a008706. doi:10.1101/cshperspect.a008706.
- [35] M.D. Brand, D.G. Nicholls, Assessing mitochondrial dysfunction in cells, *Biochem. J.* 435 (2011) 297–312. doi:10.1042/BJ20110162.
- [36] N.R. Perron, C. Beeson, B. Rohrer, Early alterations in mitochondrial reserve capacity; a means to predict subsequent photoreceptor cell death, *J. Bioenerg. Biomembr.* 45 (2013) 101–109. doi:10.1007/s10863-012-9477-5.
- [37] M.A. Hort, M.R. Straliootto, J. de Oliveira, N.D. Amôêdo, J.B.T. da Rocha, A. Galina, R.M. Ribeiro-Do-Valle, A.F. de Bem, Diphenyl diselenide protects endothelial cells against oxidized low density lipoprotein-induced injury: Involvement of mitochondrial function, *Biochimie.* 105 (2014) 172–

181. doi:10.1016/j.biochi.2014.07.004.
- [38] R. Dringen, Metabolism and functions of glutathione in brain, *Prog. Neurobiol.* 62 (2000) 649–671.
- [39] P.K. Mandal, S. Saharan, M. Tripathi, G. Murari, Brain glutathione levels - a novel biomarker for mild cognitive impairment and alzheimer's disease, *Biol. Psychiatry.* 78 (2015) 702–710. doi:10.1016/j.biopsych.2015.04.005.
- [40] E. Lubos, J. Loscalzo, D.E. Handy, Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities, *Antioxid. Redox Signal.* 15 (2011) 1957–1997. doi:10.1089/ars.2010.3586.
- [41] D.R. Boone, J.M. Leek, M.T. Falduto, K.E.O. Torres, L. Sell, M.A. Parsley, J.C. Cowart, T. Uchida, M. Micci, D.S. Dewitt, D.S. Prough, H.L. Hellmich, Effects of AAV-mediated knockdown of nNOS and GPx-1 gene expression in rat hippocampus after traumatic brain injury, *PLoS One.* 12 (2017) e0185943.
- [42] R.C. Edmunds, J.K. McIntyre, J. Adam Luckenbach, D.H. Baldwin, J.P. Incardona, Toward enhanced MIQE compliance: Reference residual normalization of qPCR gene expression data, *J. Biomol. Tech.* 25 (2014) 54–60. doi:10.7171/jbt.14-2502-003.
- [43] D.F. Meinerz, V. Branco, M. Aschner, C. Carvalho, J.B.T. Rocha, Diphenyl diselenide protects against methylmercury-induced inhibition of thioredoxin reductase and glutathione peroxidase in human neuroblastoma cells: a comparison with ebselen, *J. Appl. Toxicol.* 37 (2017) 1073–1081. doi:10.1002/jat.3458.
- [44] G.E. Mann, J. Niehueser-Saran, A. Watson, L. Gao, T. Ishii, P. de Winter, R.C. Siow, Nrf2/ARE regulated antioxidant gene expression in endothelial and smooth muscle cells in oxidative stress: implications for atherosclerosis and preeclampsia, *Sheng Li Xue Bao.* 59 (2007) 117–127.
- [45] M. Ohtsujii, F. Katsuoka, A. Kobayashi, H. Aburatani, J.D. Hayes, M. Yamamoto, Nrf1 and Nrf2 play distinct roles in activation of antioxidant response element-dependent genes, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 33554–33562. doi:10.1074/jbc.M804597200.
- [46] A. Wendel, Glutathione peroxidase., *Methods Enzymol.* 77 (1981) 325–333.
- [47] J. Panee, Z.R. Stoytcheva, W. Liu, M.J. Berry, Selenoprotein H is a redox-sensing high mobility group family DNA-binding protein that up-regulates genes involved in glutathione synthesis and phase II detoxification, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 23759–23765. doi:10.1074/jbc.M702267200.
- [48] P.J. Hissin, R. Hilf, A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues, *Anal. Biochem.* 74 (1976) 214–226. doi:10.1016/0003-2697(76)90326-2.

- [49] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1959) 70–77.
- [50] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [51] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, *Methods.* 25 (2001) 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- [52] A. Borchert, C.W. Chi, C. Ufer, H. Schiebel, N.E. Savaskan, H. Kuhn, The role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase isoforms in murine embryogenesis, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 19655–19664. doi:10.1074/jbc.M601195200.
- [53] V. Casañas-Sánchez, J.A. Pérez, N. Fabelo, A. V. Herrera-Herrera, C. Fernández, R. Marín, M.C. González-Montelongo, M. Díaz, Addition of docosahexaenoic acid, but not arachidonic acid, activates glutathione and thioredoxin antioxidant systems in murine hippocampal HT22 cells: potential implications in neuroprotection, *J. Neurochem.* 131 (2014) 470–483. doi:10.1111/jnc.12833.
- [54] Y. Kurauchi, A. Hisatsune, Y. Isohama, S. Mishima, H. Katsuki, Caffeic acid phenethyl ester protects nigral dopaminergic neurons via dual mechanisms involving haem oxygenase-1 and brain-derived neurotrophic factor, *Br. J. Pharmacol.* 166 (2012) 1151–1168. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01833.x.
- [55] S. Flowers, F. Xu, E. Moran, Cooperative activation of tissue-specific genes by pRB and E2F1, *Cancer Res.* 73 (2013) 2150–2158. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1745.
- [56] M.S. Kwon, S.K. Woo, D.B. Kurland, S.H. Yoon, A.F. Palmer, U. Banerjee, S. Iqbal, S. Ivanova, V. Gerzanich, J.M. Simard, Methemoglobin is an endogenous Toll-like receptor 4 ligand-relevance to subarachnoid hemorrhage, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 5028–5046. doi:10.3390/ijms16035028.